الاستنسال البايولوجي

الطريق الطويلة نحو دوللي والاستنساخ البشري





الدكتور
إياد محمد علي فاضل العبيدي



بسم الله الرحمن الرحيم

الاستنسال البايولوجي

الطريق الطويلة نحو دولي

والاستنساخ البشري

رقـــم التصنيـــف : 575.12

المؤلف ومن هو في حكمه : اياد محمد علي العبيدي

عنـــوان الكتـــاب: الاستنسال البايولوجي : الطريق الطويلة نحو دوللي أو الاستنساخ البشري

رقـــم الإيـــداع: (2001/1/50)

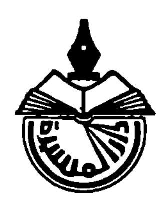
الموضـوع الرئيســي : الاستنساخ البشري

بيانـــات النـــشر : عمان-دار المسيرة للنشر والتوزيع

* - تم اعداد بيانات الفهرسة الأولية من قبل دائرة المكتبة الوطنية

الطبعة الأولى

1421هـ - 2001م



دارالمسيرة للنشر والتوزيع والطباعة

عمان - ساحة الجامع الحسيني- سوق البتراء- هاتف 4640950 فاكس 4617640

ص.ب 7218 عمان 11118 الاردن

DAR AL-MASSIRA Publishing - Distributing - Printing

Tel: 4640950 Fax: 4617640

P.O.Box: 7218 Amman - 11118 - Jordan

http://www.daralmassira.com

E-mail :info@daralmassira.com

E-mail :sales@daralmassira.com

ISBN 9957 - 06 - 106 - 2 (ردمك)

الاستنسال البايولوجي

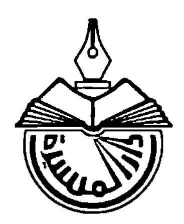
الطريق الطويلة نحو دوللي والاستنساخ البشري

الدكتور

إياد محمد علي فاضل العبيدي

الطبعة الأولى

1421هـ - 2001م



دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة

محتويات الكتاب

الإهـــداء

إلى . . .

أطفال الحصار . . .

ضحايا الجوع والنار والدمار

إلى . . .

من حفر الدمع في وجنتيه السواقي

والأرض تصرخ وتبكي.

ففي هذه البقعة . . .

ترقد جثة طفل عراقي

قتله الحصار

قتله الجوع

قتله الدمار . . .

بسم الله الرحمن الرحيم

المقدمة

بسم الله والصلاة والسلام على رسول الله (محمد بن عبد الله) خاتم الأنبياء والمرسلين وعلى آله وصحبه الكرام الميامين أجمعين.

في خضم الأحداث العظام والحوادث الجلل والتقدم العلمي غير المسبوق الذي شغل مساحات واسعة من تطلعات وآفاق القرن العشرين، فإن لكل حقبة زمنية مميزاتها الخاصة التي تنفرد بها عن غيرها، حيث شهد الربع الأخير من القرن المنصرم بروز تقنيات الهندسة الوراثية والتي رافقت التطورات الكبيرة الأخرى في مجالات علوم الحياة وعلم الأجنة والتي مهدت الطريق نحو إنتاج حيوانات ونباتات وأحياء مجهرية محورة وراثيا* وتمتلك صفات جديدة لم تكن تمتلكها بالأصل، وكان هذا الاختراق لحاجز النوع انطلاقة كبيرة لمجال جديد من التقنيات المتقدمة تعرف الآن باسم تقنيات هندسة التكاثر، وبعيداً عن إرهاصات الجهل والتقييم غير الموضوعي لحدث اكتسب أبعاداً إعلامية وربما بدرجة أكثر مما ينبغي، فإن استنسال النعجة «دوللي» كان طفرة نوعية متقدمة في مجال تقنيات هندسة التكاثر نظراً لأنها اخترقت تابو المحرمات للمرة الثانية منذ المرة الأولى التي تمت على يد «فيساليوس» في عام 1543م، حين بدأ عصر تشريح الجسد الإنساني يصبح مقبولاً.

إن المخاوف المتزايدة من إمكانية استخدام تقنيات الهندسة الوراثية والاستنسال البايولوجي في هندسة الإنسان وراثياً لها في الواقع أساس قوي من خلال توفر نواقل الاستنسال العملاقة مثل كروموسوم الخميرة الصنعي (YAC) والكروموسوم البشري الصنعي (HAC) القادر على نقل حمولة جينية تقارب (3000) جين دفعة واحدة.

ويمكن أن يفسر تلاعب الإنسان بالنظام المتوازن للحياة عن عواقب وخيمة، حيث يمكن لإنسان ما يمتلك مزيجاً من النرجسية وحب الذات وجنون العظمة أن يستنسل ذرية من النسائل المتماثلة التي تؤدي إلى اختلاط اجتماعي مربك وفي غاية التعقيد ولكن كل

هذه المخاوف قد تزول أمام مفهوم الاستنسال العلاجي الجديد والعلاج الجيني، يتضمن الكتاب ثماني فصول باستثناء المقدمة والمصادر ويتضمن الفصل الأول حقائق عن الاستنسال البايولوجي وأوهامه، يتبعه في الفصل الثاني نبذة عن التطور التأريخي لتقنيات هندسة التكاثر منذ القرن التاسع عشر وإلى بدايات القرن الحادي والعشرين، أما التقنيات التحضيرية للتطويع المجهري والاندماج الكهربائي والتقنيات المختلفة لشطر وتنصيف الأجنة فتشكل محتوى الفصل الثالث وسوف نتناول في الفصل الرابع هندسة التحوير الجيني وآفاقها وإنتاج البروتينات العلاجية باستخدام الحيوانات المحورة جينياً كمفاعلات حيوية. أما المحاولات الأولى للاستنسال البايولوجي ابتداء من استنسال الضفادع إلى القرود فقد تم التطرق إليها الفصل الخامس وشمل الفصل السادس شرحاً مسهباً وتحليلاً لتقنية النقل النووي وهي التقنية التي استخدمت في استنسال النعجة «دوللي» والتي سوف يتم التطرق إليها بإسهاب في الفصل السابع وبعنوان الطريق إلى «دوللي»، أما النواحي الأخلاقية والدينية والفلسفية للاستنسال البشري فكانت مادة الفصل الثامن.

ونلتمس من القارىء الكريم المعذرة عن أي هفوة غير مقصودة (والكمال لله وحده) وأدعو بإخلاص كافة الأساتذة والزملاء لتقديم ملاحظاتهم القيمة عن الكتاب. ويحدوني الأمل في أن يشكل هذا الكتاب إضافة نوعية إلى المكتبة العربية في مجال متطور من مجالات العلوم المتقدمة.

والله من وراء القصد.

الدكتور

أياد محمد علي فاضل العبيدي

الفصـل الأول

الاستنسال البايولوجي

الأوهام والحقائق

1 - 1 مقدمة عامة

في برهة قصيرة من الزمن حقق العلماء انجازات بالغة الدقة والروعة كانت وإلى وقت قصير تعد من المستحيل الذي لا يمكن أن يتحقق إلا بمعجزة أو سلسلة من المعجزات، ولكنها وبرغم دقتها وروعتها لا تضاهي قدرة الخالق العظيم في خلقه وإبداعه الذي لا يضاهيه شيء في الكون ﴿يا أيها الناس اتقوا ربكم الذي خلقكم من نفس واحدة وخلق منها زوجها وبث منهما رجالاً كثيراً ونساء واتقوا الله الذي تساءلون به والأرحام﴾ (سورة النساء/آية 1).

والإنسان هو معجزة هذه الحياة، إذ يقول الفيلسوف (سوفوكليس): «كثيرة هي المعجزات في الدنيا ولكن الإنسان أعظمها».

يتكون الإنسان (المعجزة) من 75 - 100 تريليون خلية، ويبلغ الطول الكلي للشرايين الدموية في جسم الإنسان حوالي 100.000 كيلومتراً وكل خلية حمراء تحتوي على 270 مليون جزيئة هيموكلوبين، ويضخ قلب الإنسان البالغ 10.000 لتراً من الدم يومياً ويستوعب الدماغ خلال حياة الإنسان (متوسط العمر) حوالي عشرة كوادرليون وحدة من المعلومات، ويضم الجهاز العصبي حوالي 10 مليارات خلية عصبية، ويحتوي جلد الإنسان على 250 ألف مقياس للبرد و 30 ألف مقياس للحرارة ومليون لقياس درجة الألم، ونصف مليون لحاسة اللمس، ويحتوي اللسان على 9000 مقياس للتذوق.

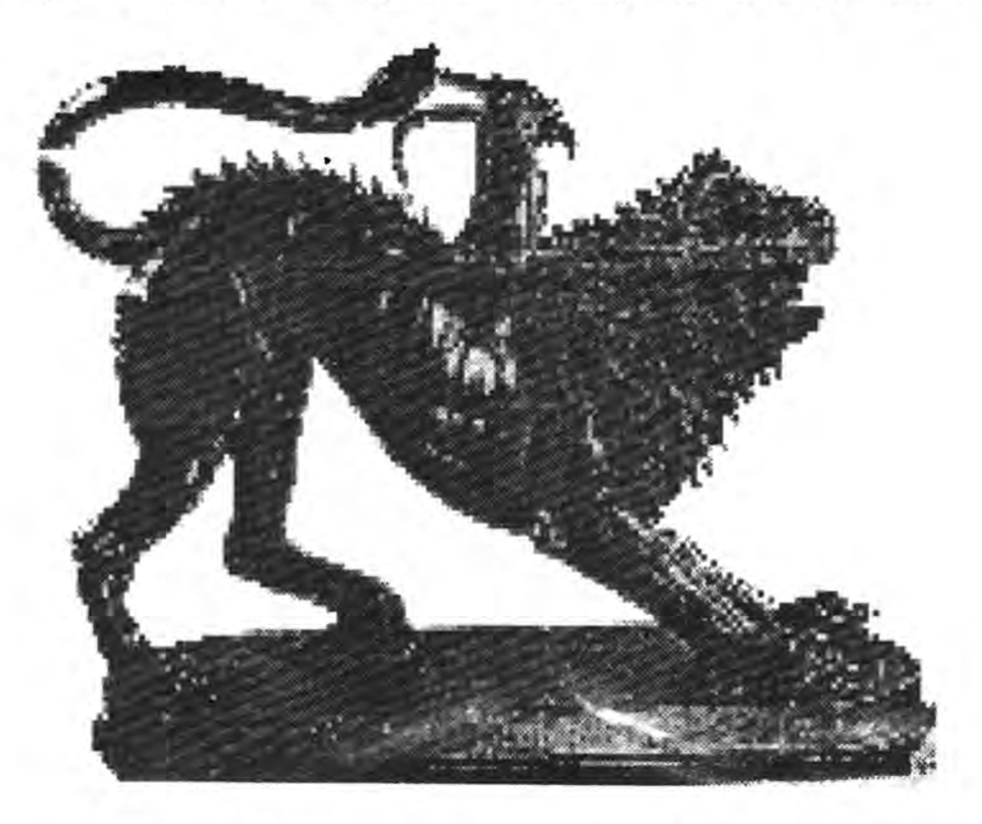
أما الأذن الداخلية فتضم حوالي 25000 خلية تتأثر بالأصوات وتلتقط ذبذبات تتراوح بين 16 - 2000 هيرتز، ويستطيع الإنسان إدراك الصوت خلال 35 - 175 ملي ثانية بعد وصوله للأذن وهذه الحقائق المدهشة تظهر عظمة الخالق وإبداعه.

وكانت الحكمة الإلهية في خلق الأنواع واضحة وماثلة في تمايزها وتباينها عن بعضها ووجود ذلك الحاجز (حاجز الأنواع) الفاصل بينها، حيث كان حلم الإنسان ومنذ

فجر الحضارات أن يخترق حاجز النوع ويصل إلى أقصى حدود القوة والكمال والذي تمثل بحيوان الكايميرا الخرافي (الشكلI - I) في الأساطير الإغريقية.

وتشير الإسطورة الإغريقية المشهورة أيضاً إلى وحش مخيف يعرف باسم (مينوتور) نصفه إنسان ونصفه الآخر بهيئة ثور يعيش في جزيرة كريت.

وكان طعام هذا الوحش المخيف مقصوراً على لحم البشر، وكان سكان الجزيرة يقدمون له سبعاً من الفتيات الجميلات كل عام يضحون بهن في سبيل تركهم يعيشون في الجزيرة بسلام واستمروا في تقديم الأضاح والقرابين سنوياً حتى قيام المعركة الكبرى بين البطل (ثيسيوس) والوحش والتي قضى فيها هذا البطل نهائياً على الوحش الأسطوري.



الشكل (I -1): حيوان الكايميرا Chimaera الخرافي بجسم الأسد ورأس الماعز وذيل الأفعى والذي يبصق النار من فمه، هو جزء من الأساطير الإغريقية.

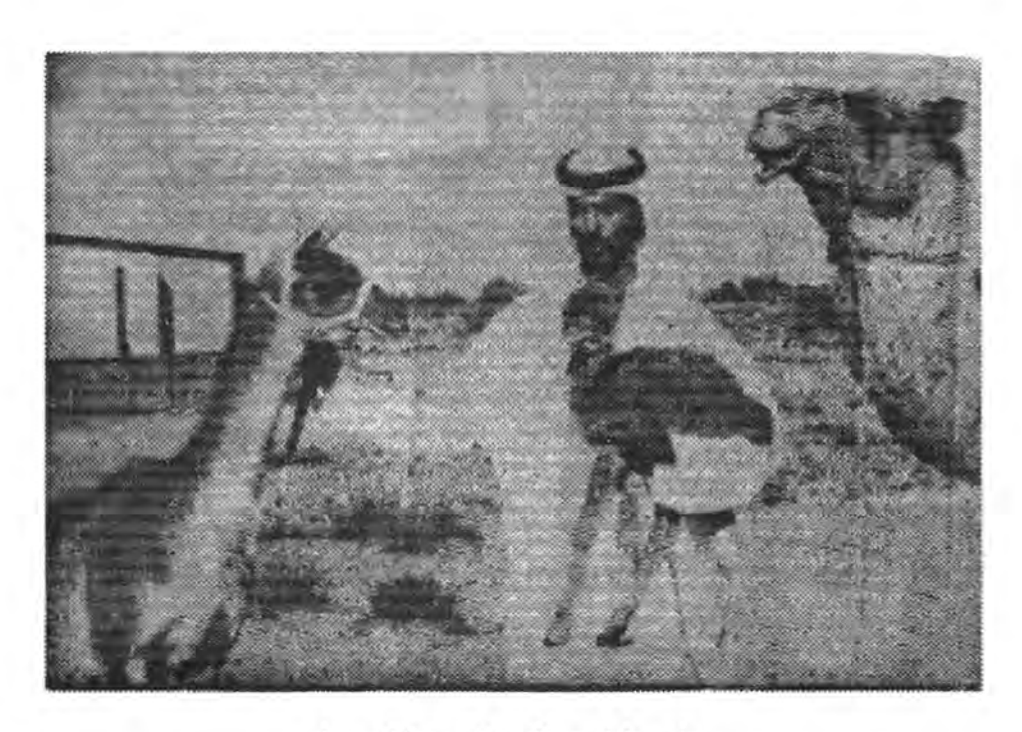
وشملت الأساطير حضارات أخرى فتضمنت الحضارة الفرعونية الرمز الأسطوري (أبا الهول) وهو تمثال برأس إنسان وجسم أسد، وحضارات وادي الرافدين الأكثر تقدماً (أسطورة ملحمة كلكامش وتمثال الثور المجنح)، وفي حضارات الشرق الأقصى في الصين واليابان والمتمثلة بحيوان التنين المجنح الحارق الأسطوري.

وكل هذه الخرافات والأساطير التي نسجها الإنسان القديم كانت تعبيراً عن توقه للمعرفة والكمال وعجزه في الوقت ذاته عن تقديم التفسير الصحيح لغموض أسرار الخلق والنشوء والتطور.

ولا تزال رغبة الإنسان في التدخل في السيرورات الطبيعية متأججة فهو يحاول دائماً أن يساهم في إيجاد واستيلاد أنواع جديدة من الحياة وإن لم يكن مبدعها، فتمكن من إنتاج حيوان الراما (الشكل 1 - 2) والذي أنتج كهجين من تزاوج حيوان الجمل العربي بحيوان اللاما الذي يعيش في جبال أمريكا الجنوبية.

وعلى الرغم من أهمية الوراثة التقليدية وطرق التهجين التقليدية في تحسين النوع والحصول على صفات مرغوبة يمكنها التوارث بثبات فإن انبثاق عهد جديد من تقنيات الهندسة الوراثية والتي بدأت خطواتها الأولى في عام 1971، حين أكتشفت مجموعة من الأنزيمات لها القدرة على قطع أشرطة الدنا ونقلها باستخدام نواقل خاصةمن نوع لآخر مخترقاً حاجز النوع وممتلكاً القدرة على انتخاب ما يشاء ويرغب من الصفات المرغوبة لنقلها إلى الأنواع المهندسة وراثياً والتي يمكنها اكتساب الجينات المنقولة وإدغامها بنجاح في موروث كينونتها وإنتاج البروتينات الإضافية التي تشفر لها الجينات المنقولة، حيث تتوارث الصفات المكتسبة بثبات.

إن القدرة اللامتناهية على التلاعب الوراثي تجعل الإنسان النوع الحي الوحيد الذي يمكنه التدخل في سيرورات النشوء والتطور بغض النظر عما يثيره ذلك من اعتراضات أخلاقية أو دينية. ولم يكن استنسال النعجة «دوللي» سوى الخطوة الأولى والأكثر واقعية نحو سيرورة التطور الموجه.



رامــا ابن الجمل واللامــا

الشكل(1-2) : يمكن إنتـاج هجـائن من الأنواع الحـيوانـية المتـقـاربة وغـالباً مـا تمتـاز هذه الهجائن بقوة التحمل ولكنها قد تكون عقيمة، في الشكل تمكن الخبراء في دولة الإمارات العربية المتحدة من الحصول على هجين من تزاوج الجمل واللاما سمي «راما».

وأثارت قدرة الـهندسة الوراثيـة الخيال نحـو المزيد من الأفكار الأكـثر تطرفاً، ومـنها إعادة الحياة للكائنات الحيـة المنقرضة، إذ أشار عالمان اكتشفا ذبابتين مـحفوظتين في (حجر الكهرمـان) مع عناصرهمـا الخلوية الكاملة يعـود عمرهـما إلى 95 مليون سنـة مضت إلى إمكانية تطبيق التقنـيات المتقدمة في استخلاص الدنا والصـبغيات الوراثية فيهـما لاستنسال ذبابة جديدة ولكن بعمر وراثي يبلغ ملايين السنين.

إن إيقاظ الحياة الغافية منذ الأزل (جزيئات الدنا هي جزيئات كيميائية بحتة «إن صح التعبير» فإذا ما تمت المحـافظة عليها من الأكسـدة والتميؤ فـإنه يمكن استعادة قـدرتها على التعـبير بوجـود منظومات وأنزيمات التـضاعف والاستنسـاخ والترجمـة) وللايين عدة من

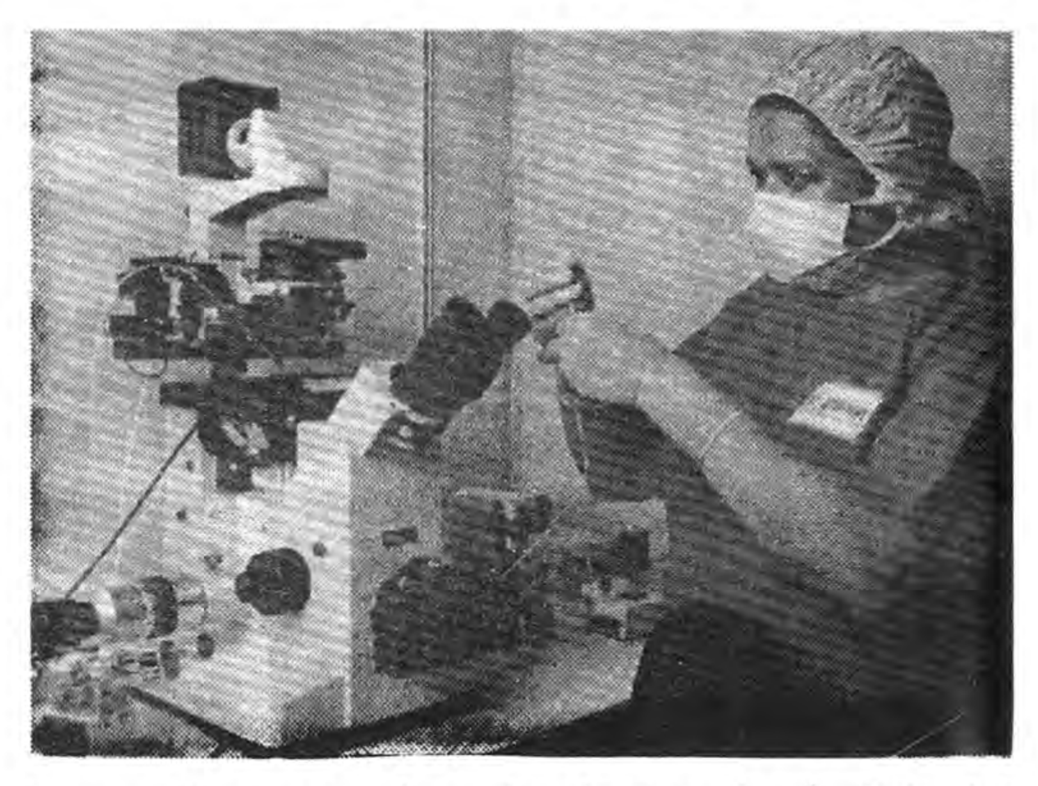
السنين، قد يكون حلماً قابلاً للتحقيق جزءاً أم كلاً، من خلال الاكتشافات الحديثة للأحافير والمستحاثات، حيث عثر العالم «سوهند ريكسون» على ديناصور متحجر من نوع (تريناصورديكس) آكل اللحوم، ويقدر عمره بـ 25 مليون سنة في صحراء داكوتا الجنوبية ويعتبر أكبر وأكمل ما عثر عليه لحد الآن، كذلك تم العثور على مجموعة من بيض الديناصور في مقاطعة «هيتان» الصينية، ويقدر عمر هذا البيض بين 65 - 125 مليون سنة، وعندما تم فحصها بأشعة الليزر بينت إحداها احتوائها على جنين ديناصور هو الأول من نوعه وربما يكون أهم اكتشاف في القرن العشرين المنصرم، وأطلق على الجنين اسم نيكول (Necole).

واكتشفت عالمة كندية أخرى في مقاطة «البرتا الغربية» 10 بيوض للديناصور تعود إلى أكثر من 70 مليون عام وإنها قد تعود إلى نوعين غير مكتشفين لحد الآن من حيوان الديناصور.

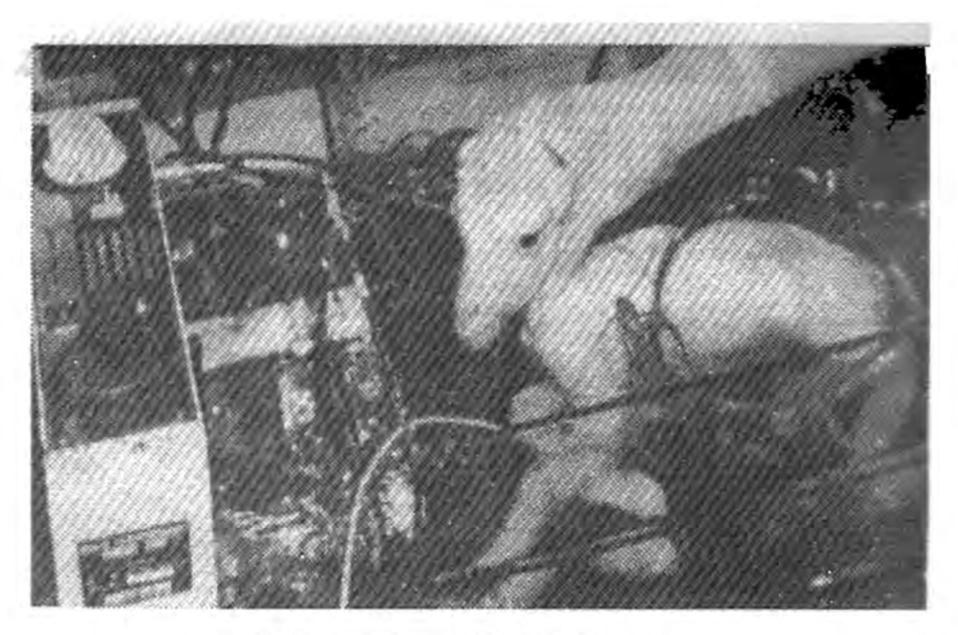
وفي صقيع سيبيريا في روسيا اكتشف المئات من حيوانات الماموث المنقرضة وهي الأجداد أو السلف الأول للفيلة الحالية، مطمورة ومدفونة تحت الجليد، وإن نقل بعض الجينات أو المادة الوراثية لخلايا الماموث وإيلاجها في موروث الحيوانات الضخمة الموجودة حالياً كالفيلة، بل وربما يمكن تصنيع أي تعاقب من الدنا القديم باستخدام جهاز يعرف بمخلق الدنا DNA Synthesizer ، حيث اكتسبت الدراسات حول الدنا القديم قدراً كبيراً من الواقعية من خلال الدراسات التي أجراها العالم «سفانتي بابو» Svante Paabo الذي أجرى دراسات مكثفة على هيكل عظمي لإنسان نياندرتال وبينت نتائج دراسته أن إنسان نياندرتال ليس هو السلف الأصلي للإنسان العاقل الحالي.

وأجرى هذا الباحث أيضاً دراسة على 23 مومياء مصرية ونجح في تحديد تسلسل القواعد النتروجينية في حوالي 5% من الدنا العائد لهذه المومياءات. فهل نتوقع يوماً أن يحمل أطفال اليوم بعضاً من جينات أسلافهم من الفراعنة، وهناك أفكار أكثر تطرفاً فهل يمكن باستخدام تقنية الاستنسال أن تمزج نواة سليمة المحتوى الكيميائي (رغم كونها غير حية) لأحد المومياءات في بويضة إمرأة من عصرنا الحاضر للحصول على طفل هو نسخة طبق الأصل من فرعون مصري توفي قبل 4000 عام.

إن التطور المذهل في تقنيات وأساليب الحقن المجهري (الشكل 1 - 3) أدى إلى تقدم كبير في القدرة على التطويع المجهري للبيوض والإخصاب الخارجي، وإلى تطور كبير في تقنيات الاستنسال مع التطور العلمي الكبير في حلقات أخرى من هندسة التكاثر، مثل تطوير جهاز للرحم الاصطناعي (الشكل 1 - 4) سيؤدي إلى زيادة قدرة الإنسان في التحكم بعمليات التطويع والاستهداف الجيني والاستنسال، وقد يؤدي الدمج بين تقنيات التحوير الجيني والهندسة الوراثية وتقنية الاستنسال إلى امتلاك الإنسان لصفات كانت حكراً على الحيوانات (الشكل 1 - 5) فهل يعد هذا التطويع الجيني تحسيناً للنوع البشري أم انحداراً رهيباً نحو العشوائية البايولوجية، يقول سبحانه وتعالى في محكم كتابه العزيز: ﴿ **لقد خلقنا الإنسان في أحسن تقويم** ﴾ (سورة التين/ آية 4) .



الشكل (1 - 3) : **أدى تطور تقنيات الحقن المجهري إلى حدوث تقدم كبير في تقنية الاستنسال البايولوجي.**



نعـجة يابانيـة من رحـم اصطنـاعي

شكل (I-4) : جهاز الرحم الاصطناعي . . . نجح العلماء اليابانيـون في استيلاد نعجة من رحم اصطناعي.



الشكل(1 - 5) : هل يمكن باستـخدام تقنيـات الهندسة الوراثية للإنـسان أن يكتسب نعـومة القطة وشراسة الذئب وخفة الخلد ودهاء الثعلب وذكاء القندس.

1 - 2 المادة الوراثية ... الدنا DNA وأسرار الجينات

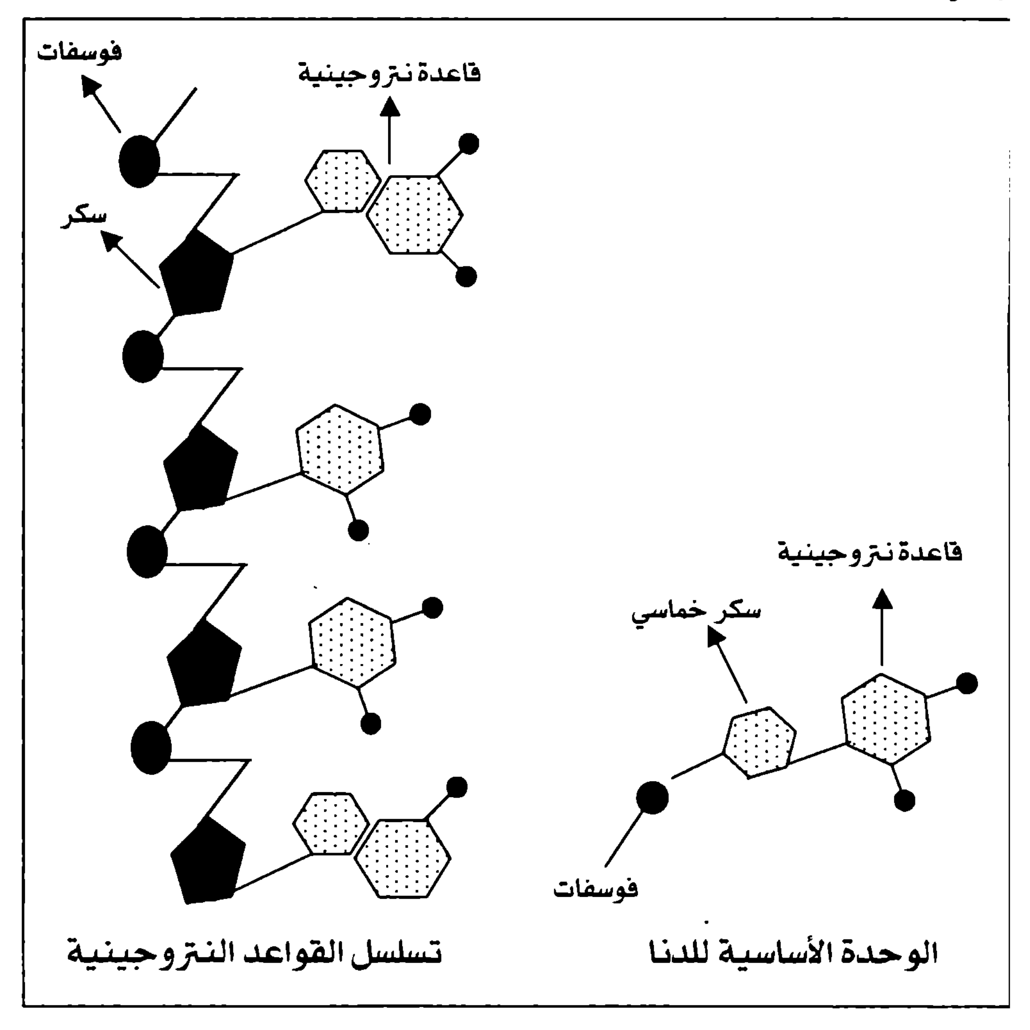
أدرك الإنسان أهمية الوراثة منذ أكثر من عشرة آلاف عام من سجل الحضارة والتاريخ البشري المدون، وربما كانت التطبيقات الزراعية ومحاولة الفلاح البدائي انتخاب أفضل الحبوب من أجل الإنتاج الغزير، وربما كان القربان الذي قدمه كل من قابيل وهابيل هو الدليل الأول على أول عملية انتخاب في التاريخ. فقدم الأول أسوأ ما لديه من شعير في حين اختار الثاني أفضل ما لديه من الخراف قرباناً إلى الله (سبحانه وتعالى) الذي تقبل من هابيل ولم يتقبل من قابيل. . . إلى آخر القصة المعروفة.

وكان الفراعنة يضعون أفضل الثمار والحبوب مع المومياءات في القبور، ولكن المعرفة العلمية بأسس انتقال الصفات المرغوبة من جيل إلى جيل ربما كان يسودها الشيء الكثير من الغموض إلى أن حدث التطور الأكثر أهمية في علم الوراثة حينما توصل «كريكور مندل» إلى قوانينه المعروفة في أواسط القرن التاسع عشر، حيث اكتشف العوامل المسؤولة عن انتقال الصفات الوراثية (الجينات) وبسبب جمود الفكر الإنساني وعدم استجابته للتغير السريع في المفاهيم آنذاك، تم إهمال النتائج الرائعة التي توصل إليها العالم «مندل» إلى أواخر القرن المذكور، حيث أدى التطور المتسارع في تقنيات علم الوراثة إلى إعادة اكتشاف ما توصل إليه «مندل».

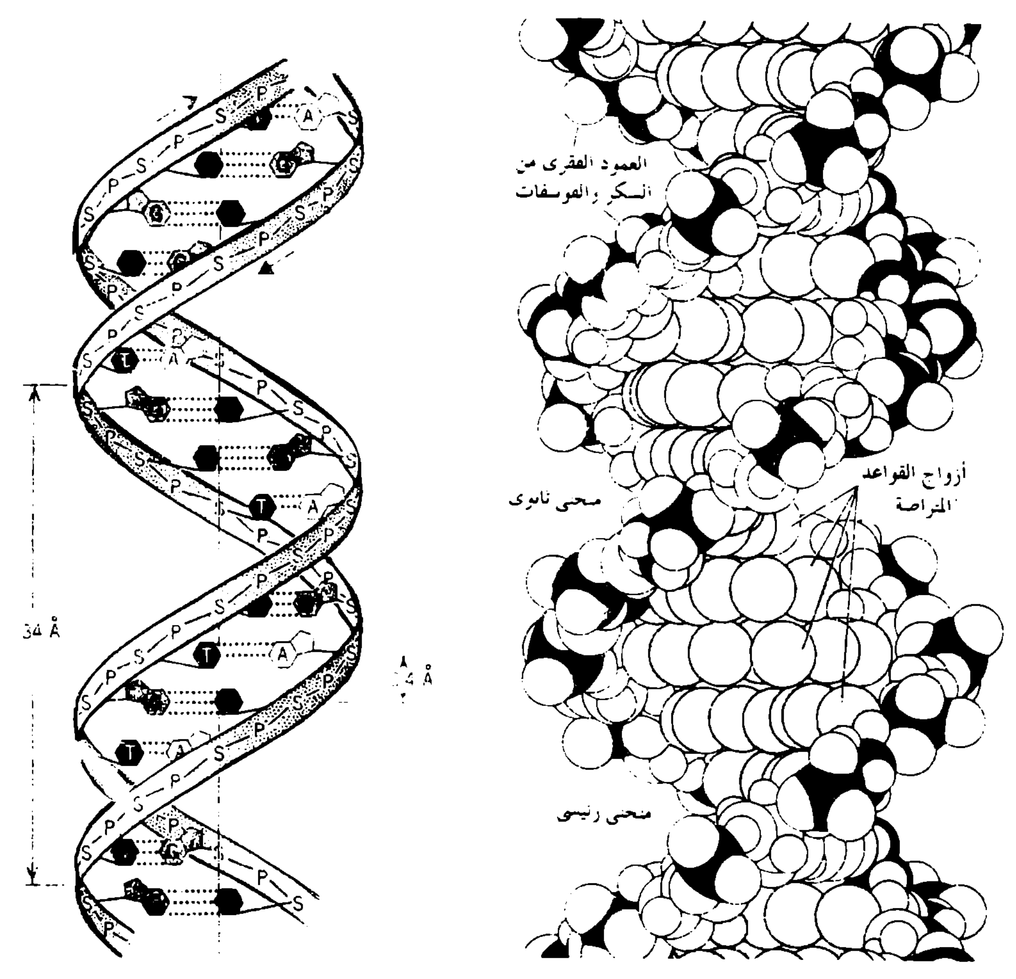
وفي عام 1868 اكتشف العالم «فريدريك ميشر» أن الكروموسومات تتكون بصورة رئيسية من البروتينات والأحماض النووية، وفي عام 1889 تمكن العالم «آلتمان» من فصل الأحماض النووية عن البروتين، وتمكن العالمان «بيدل وتاتوم» في عام 1940 من التوصل إلى فرضية جين واحد للأنزيم الواحد one gene - one enzyme أي أن كل جين يكون مسؤولاً عن التشفير لإنتاج أنزيم واحد.

وفي عام 1953 حدث الاكتشاف الأكثر أهمية في تاريخ الكيمياء الحياتية والأحياء الجزيئي، إذ توصل كا من واتسون وكريك إلى نموذج التركيب ثلاثي الأبعاد للحامض النووي وكانت تلك هي خطوة البداية نحو علم الأحياء الجزيئي الحديث.

يشكل السكر الخماسي منقوص الأوكسجين والفوسفات العمود الفقري لسلسلة ... ويشكلان مع القاعدة النتروجينية وحدة بناء مادة الدنا وهي النيوكليوتايد، ويرتبط ... نيوكليوتايد في سلسلة الدنا مع الآخر بأواصر فوسفاتية ثنائية الأستر (الشكل I - 6) ... ترتبط كلا السلسلتين في خيط الحلزون المزدوج ببعضهما من خلال الأواصر ... هيدروجينية بين القواعد النتروجينية (الشكل I - 7) وهي ثلاثية بين السايتوسين ... كوانين وثنائية بين الأدنين والثايمين.



الشكل (I - 6): الوحدات الأساسية للحامض النووي وتسلسل القواعد النتروجينية وارتباطهما مع الفوسفات والسكر الخماسي.



الشكل(1 - 7) : تركيب الدنـا ويوضح الحلزون المزدوج المكون من شريطين مـتتامين مـتكاملين ويرتبطان من خلال الأواصر الهيدروجينية التي تربط بين القواعد النتروجينية فيهما.

1 - 2 - 1 أين تقع الجينات

تختلف أعداد الكرومـوسومات باختلاف الكائنات الحيـة وتتراوح بين اثنين إلى عدة مئات، فعددها في الحصان 66 والأغنام 54 وذبابة الفاكهة 8 والفأر المنزلي 40 والفراشة الإسبانية 380 والخلية الجسدية للإنسان تحتوي على 46 كروموسوم.

ويحتوي كل كرومـوسوم في الخلايا حقيقيـة النواة على جزيئة دنا DNA مزدوجة

كبيرة (الشكل 1 - 8) وتكون جزيئة الدنا في الخلايا حقيقية النواة مستقيمة وغير دائرية، يحمل كل كروموسوم طاقم من الجينات (حاملات الصبغة الوراثية) الخاصة به وتشكل جينات بأجمعها الموروث genome .

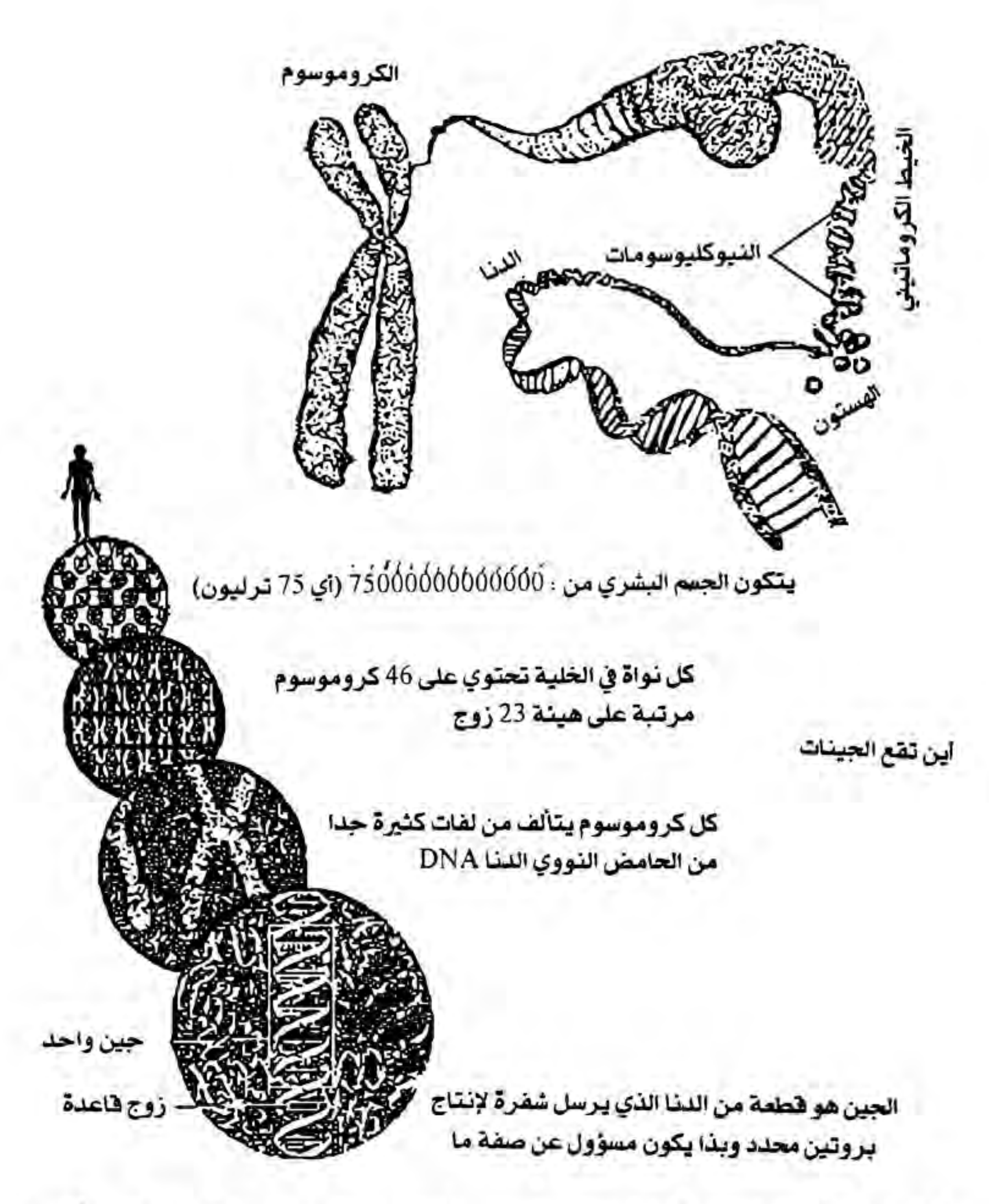
وتسمى الكروموسومات (الصبغيات) في حالة الخلايا غير المنقسمة بالكروماتين Chromatin وتكون غير منتظمة وعشوائية الانتشار خلال جميع أجزاء النواة، ويتكاثف كروماتين حال تهيأ الخلية للانقسام وينتظم في أعداد من الكروموسومات متخصصة لكل نوع.

ويوجد الدنا في الكروماتين متحد بشدة مع بروتينات تسمى بالهستونات Histones تكون وظيفتها رزم وتنظيم الدنا في وحدات تركيبية تسمى بالنيوكليوسومNucleosome.

يشكل الجين قطعة من الدنا تحوي على سلسلة من الشفرات تشفر لببتيد واحد أو جزيئة رنا RNA والمفهوم الجزيئي للجين يتمثل بكونه ذلك الجزء أو تلك القطعة من الكروموسوم التي تعين أو تشفر لأنزيم واحد (رغم أن بعض الجينات تشفر لبروتين غير أنزيمي) يحتوي الموروث البشري على جينات عددها بحدود 90 ألف - 120 ألف جين. ويهدف مشروع تحديد الذخيرة الوراثية البشرية إلى تحديد مواقعها ووظائفها جميعاً.

1 - 3 مفهوم الاستنسال (الاستنساخ):

كان الإعلان عن استنسال النعجة «دوللي» في عام 1997 وقع الصدمة، فهي أول حيوان من الثدييات يتم استنساله من خلية جسمية متخصصة ومتمايزة وسرعان ما تداول الناس مصطلح الكلونة (Cloning) على أنه من المصطلحات اللغوية الجديدة، ولم يكن هذا في الواقع على شيء من الصحة، إذ استخدم علماء الوراثة والنبات منذ عشرات السنين هذا المصطلح، فماذا تعني مصطلحات: الكلون Clone والكلونة Cloning و مصطلح (Asexual clonal Reproduction) .



الشكل (1 - 8) :تركيب الكروموسومات في الخلايا الحقيقية النواة (الشكل الأعلى) وموقع الجينات في الإنسان (الشكل الأسفل).

يعود أصل كلمة (Clone) أو (Klon) إلى اللغة اليونانية وتعني البرعم الوليد أو الغصين. ويستعمل بعض العلماء مرادف النسيلة أو السليلة، فالنسل في اللغة

عربية هو الخلق، والنسل: الولد أو الذرية، والجمع أنسال (وتناسلوا أي ولد بعضهم بعضاً)، وفي القرآن الكريم: **﴿فإذا هم من الأجداث إلى ربهم ينسلون﴾** (سورة يس/ الآية 51).

ويمكن تعريف النسيلة (Clone) بأنها مجموعة من الخلايا أو الأفراد المتماثلة وراثياً والناتجة من خلية واحدة أو من فرد واحد عن طريق الانقسام الخلوي المايتوزي، فالمستعمرة البكتيرية الناتجة من خلية بكتريا واحدة مزروعة في طبق بتري هي نسائل أو كلونات.

أما مصطلح الكلونة Cloning فيأتي بمعنيين، الأول هو التنسيل أو الاستنسال وهو عملية إنتاج أفراد متماثلة وراثياً من أحد الأبوين، ويطلق البعض على هذا المعنى مرادف «الاستنساخ» والاستنساخ في اللغة العربية بعنى كتب كتاب من كتاب، ويقال نسخ الشيء ينسخه نسخاً وانتسخه واستنسخه، وفي كتاب الله العزيز: **﴿إنا كنا نستنسخ ما كنتم تعملون﴾** (سورة الجاثية/ الآية 29).

ويرد النسخ أيضاً بمعنى تبديل الشيء من الشيء أو بمعنى الإزالة، ويقابل كلمة الاستنساخ باللغة الإنكليزية كلمة (Transcription) والتي تطلق على عملية استنساخ الدنا DNA إلى رنا مرسال m - RNA وتكوين نسخ Copying منه.

أما المعنى الثاني للاستنسال فهو عملية استنسال الجينات وأكثارها باستخدام تقنيات الهندسة الوراثية، وكما سيرد ذكره لاحقاً، أما مصطلح Asexual Clonal Reproduction ويعني التكاثر الاجنسي النسيلي فربما يعد الأكثر قرباً من معنى التقنية المستخدمة في استنسال «دوللي»، حيث يمكن تعريفه بأنه عملية إنتاج توائم أو مجاميع من التوائم عن طريق صيغة من صيغ التكاثر اللاجنسي، أو هو تكوين كائن كامل من خلية واحدة عن طريق غير طريق التكاثر الجنسي المعتاد، وبالرغم من أن مصطلح التكاثر اللاجنسي النسيلي هو الأكثر دلالة على مفهوم مصطلح الكلونة Cloning فإن عدم شيوعه يجعلنا نستخدم مصطلح الاستنسال للدلالة على هذه التقنية.

وتتوفر في الوقت الحاضر ثلاثة أنواع من هذه التقنية:

1 - الاستنسال الجيني Gene cloning :

تعد هذه التقنية جزءاً من تقنيات الهندسة الوراثية وتعرف أيضاً بتقنية التأشيب الوراثي للدنا (Recombinant DNA Technology) وقد ظهرت للوجود لأول مرة في عام 1973، حين توصل كل من «هيربرت بوير» و «ستانلي كوهين» إلى أول استراتيجية لتقنية التأشيب الوراثي للدنا وباستخدام نواقل الاستنسال البلازميدية.

وتمكن العالمان في الثاني من كانون أول عام 1980 من الحصول على أول براءة اختراع في حقل المواد الحية، وتعتمد التقنية على تقطيع الدنا بالأنزيمات القاطعة المناسبة وعزل الجينات المطلوب استنسالها وباستخدام نواقل مناسبة للاستنسال (Cloning Vectors) يتم إعادة لحم وارتباط الجينات المرغوبة والتي تشفر لإنتاج البروتين المطلوب ضمن جزيئة الدنا الناقل والحصول على جزيئة ناقل هجينة (Recombinant) والتي يتم إيلاجها فيما بعد في البكتريا بطرق مختلفة منها طرق التحول الوراثي، وهناك طرق متقدمة أخرى كالتثقيب الكهربائي (Electroporation).

ونظراً لقصر زمن الجيل للبكتريا وتكاثرها السريع فإن أعداداً هائلة من النواقل ونسخ الجين المطلوب يمكن الحصول عليها في وقت قصير نسبياً.

هذا ولا تقتصر عملية الاستنسال الجينيُ على البكتريا، حيث يمكن استخدام التقنية في إنتاج الحيوانات عبر الوراثية، وكما سيرد ذكره في الفصل الرابع.

2 - الاستنسال الخلوي Cellular Cloning:

يتم الاستنسال الخلوي بفرز وفصل أو تفريق خلية واحدة ذات تركيب ووظيفة معروفة وشكل محدد تسمى النسيلة يتم تنميتها في أوساط زرعية نسيجية خاصة لغرض تنسيلها وبذلك تعطي نوعاً من واحداً من الخلايا المتميزة ذات التركيب والوظيفة المتماثلة، ويمكن استخدامها في عدد كبير من التطبيقات كالعلاج الجيني، وفي إنتاج الأجسام المضادة وحيدة النسيلة Monoclonal Antibody وفي دراسات التمايز الخلوي وتحول الخلايا الورمية.

3 - الاستنسال الجنيني Embryo or Fetal Cloning :

تعد هذه التقنية التي تسمى أحياناً بالانشطار الجيني أحد التقنيات المهمة في الحصول على نسخ متطابقة تماماً من النسائل (توائم متماثلة) وتمكن العالم «ويلادسن» في عام 1985 من تطبيقها على الأغنام، وفي عام 1993 تم الحصول على 17 جنين بشري باستخدام هذه التقنية. ويقسم الاستنسال الجنيني إلى نوعين:

1 - **الاستنسال بطريقة فصل الخلايا:** وتكون الأجنة الناتجة متطابقة تماماً وذلك لأن مصدر المادة الوراثية هو واحد وقد تم تطبيق هذه التقنية على الضفادع والفئران والأغنام (الشكل 1 - 9 القادم) وأخيراً الإنسان.

2 - **الاستنسال بتنشيط البويضة غير المخصبة:** تعد هذه التقنية تطبيقاً لفكرة التكاثر العذري Parthenogenesis وتعتمد هذه التقنية على تحفيز وحث البويضة غير الملقحة على بدء التكاثر والانقسام ولا تزال هذه الطريقة قيد التجربة والاختبار.

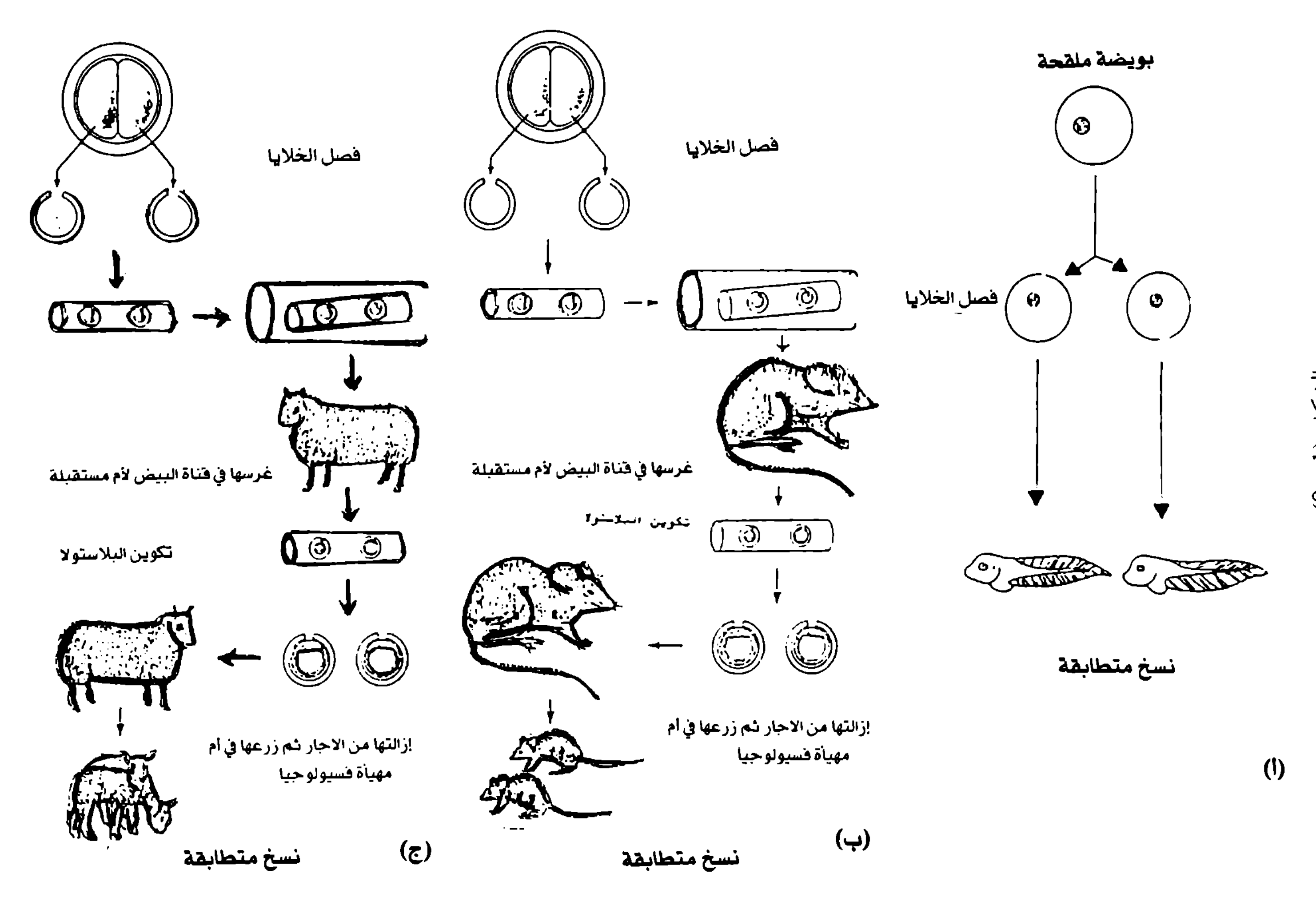
3 - **الاستنسال بتنشيط الخلية الجنينية المتحدة مع البويضة منزوعة النواة:** استخدمت هذه التقنية في عام 1995 من قبل «ويلموت» لاستنسال النعجتان «ميكان» و «موراك».

4 - الاستنسال بتقنية النقل النووي Nuclear Transfer :

تعود هذه التقنية إلى عام 1952، حيث أجريت العديد من التجارب الناجحة على البرمائيات والضفادع خصوصاً وتعد هذه التقنية من أكثر التقنيات موثوقية (رغم أن نسبة النجاح ليست عالية) ولكن التجارب اللاحقة التي أعقبت استنسال النعجة «دوللي» أعطت نسب نجاح بلغت في اليابان بحدود 80 %.

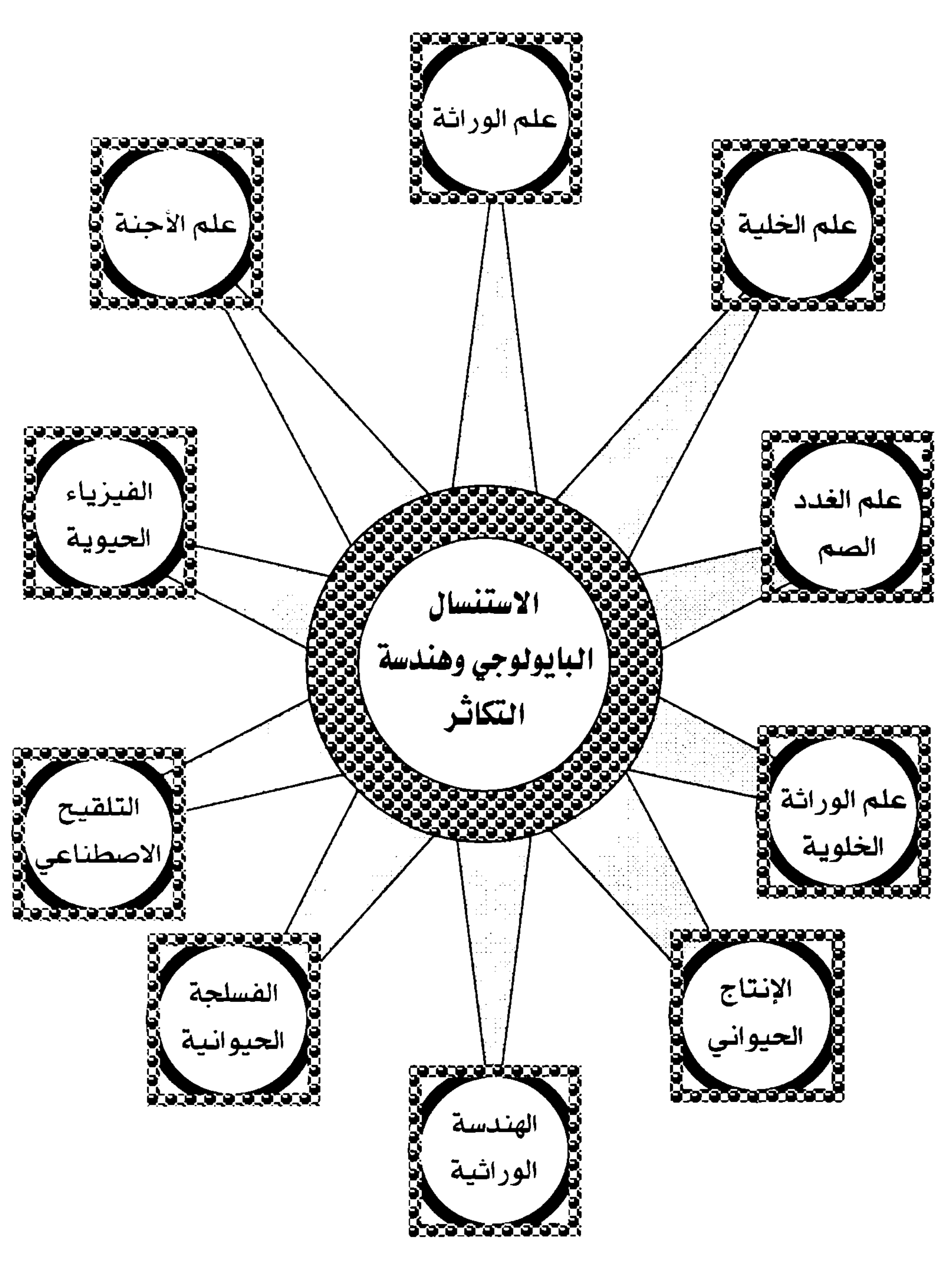
ويعمل العلماء على تطوير التقنيات المستخدمة والتي ترتبط بتقنيات تعود لعلوم مختلفة (المخطط1 - 1).

إن الاهتمام المتزايد بتقنيات الاستنسال البايولوجي يتعلق بالمدى الواسع من التطبيقات التي توفرها هذه التقنيات(المخطط1 - 2) والتي تتباين بصوة واسعة في إمكانياتها ودرجة واقعيتها أو تطرفها.

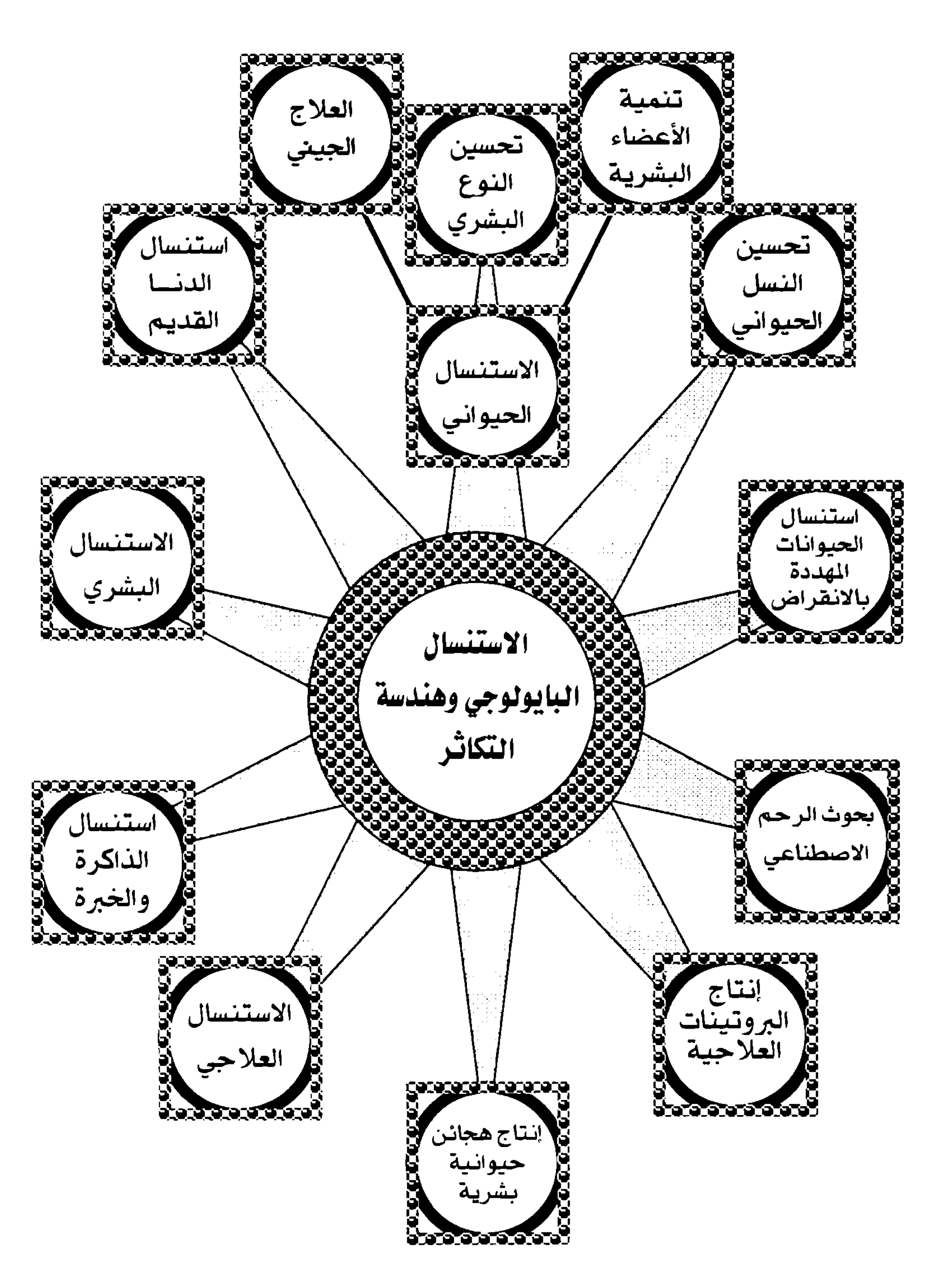


الشكل (1 - 9)

الاستنساخ بطريقة فصل الخلايا ، (أ): في الضفدع ، (ب): في الفأر ، (ج): في الأغنام



المخطط (1 - 1): ارتباط الاستنسال البايولوجي وهندسة التكاثر بالعلوم والتقنيات الأخرى



المخطط (1 - 2): التطبيقات المحتملة لتقنيات الاستنسال البايولوجي وهندسة التكاثر.

الفصل الثاني

التطور التاريخي

لتقنيات التحوير الوراثي

و

الاستنسال البايولوجي

هندسة التكاثر

من القرن الثامن عشر إلى القرن الحادي والعشرين

لم يكن انبثاق تقنية الاستنسال البايولوجي واستنسال «دوللي» أول وأشهر نعجة في التاريخ على الإطلاق وليد المصادفة البحتة بل كانت نتيجة لبحوث مضنية على فترات زمنية متباعدة واستمرت زهاء ثلاثة قرون، ولنعود قليلاً إلى تلك الحقبة من التاريخ وإلى القرن الثامن عشر بالتحديد لنجد أن أوربا التي كانت غارقة في سبات العصور الوسطى وظلامها الدامس قد بدأت تفيق على أولى مراحل الثورة الصناعية الوليدة والتي سار معها جنباً إلى جنب تطور العلوم الطبية والمعرفة العلمية ومنها مجال يعرف الآن بـ «هندسة التكاثر» ويعنى هذا المجال بكافة التقنيات التي تتعامل مع موضوع الإخصاب والتكاثر وعلاج العقم، وأخيراً التكاثر اللاجنسي النسيلي أو الاستنساخ (Cloning)، ففي عام 1745 اكتشف العالم «بوينت» قدرة بيوض بعض الحشرات على النمو بصورة عذرية (بدون الحاجة إلى التخصيب من الذكر).

وفي العام 1780 حدث إنجازان مهمان، الأول هو تمكن العالم الإيطالي «سبالنزاني» من تلقيح الكلاب اصناعياً، أما الإنجاز الثاني فكان أول تلقيح ناجح لامرأة بحيامن الزوج (AIH) . أما في العام 1884 فقد شهد إنجازان آخران وهما تمكن العالم الإنكليزي «هيب» من تلقيح الكلاب والخيول اصطناعياً وإجراء أول تلقيح داخل الرحم (IUI) بحيامن متبرع.

وفي عام 1914 تمكن العالم الإيطالي «أمانتيا» من تصميم أول مهبل اصطناعي، أما في عام 1926 فقد شهد اكتشاف محفزات القند hCG,FsH,LH . وشهدت الحقبة الزمنية بين عامي 1930 - 1940 عدة محاولات للحصول على المحفزات من مصادر طبيعية (كالإدرار) وتحديد دورها والعوامل المؤثرة عليها. وفي هذه الحقبة أيضاً تطورت طرق التلقيح الصناعي بسرعة، إذ تمكن الروس من تلقيح قرابة 1.2 مليون بقرة و 15 مليون نعجة و 120ألف فرس اصطناعياً في عام 1938، وفي عام 1947 تم استخلاص المحفز hCG من البول البشري، أما استخلاص المحفز hMG فقد تم استخلاصه من

بول النساء في سن اليأس في عام 1949، وشهد أواسط القرن العشرين وتحديداً عام 1952 مولد علم التجميد البايولوجي، حيث استخدم الكحول والثلج الجاف في تجميد السائل المنوي، وشهد هذا العام إجراء أول عملية استنسال لضفادع من خلايا لفرخ الضفدع (الشرغوف) من قبل العالمين «روبرت بريكز» و «توماس كنك»، وفي عام 1956 تم تصنيع الكلومفين (أول محفز صناعي للإباضة)، وتحقق عام 1958 نجاح كبير على يد العالم «كار كمزل» حين تمكن من تحفيز الإباضة باستخدام هرمونات بشرية مستخلصة من الغدد النخامية للجثث والتي كانت تستخلص بكميات ضئيلة حيث (لا تكفي الهرمونات المستخلصة من 50 غدة لخمسين جثة سوى لتحفيز دورة إباضة واحدة فقط)، وفي عام 1961 - 1965 تمكن العلماء من فك رموز الشفرة الجينية بأكملها.

وحدث التقدم الأكثر أهمية في تسارع استعمال محفزات القند في تحفيز الإباضة في عقد الستينات وتمكن العالم «جون كوردن» في عام 1962 من استنسال الضفادع من خلايا لشرغوف ضفدع أكبر عمراً، ،في عام 1978 حدث التطور الأكثر أهمية في تقنيات الإخصاب الخارجي، حين أعلن عن ولادة الطفلة «لويزا براون» وهي أول طفلة أنابيب تم ولادتها باستخدام التقنية التي أسسها العالمان «إدواردز و ستبتو» وحققت تقنيات التحوير الجيني تقدماً كبيراً حين أعلن في عام 1982 عن إنتاج الفأر والجرذي العملاق الذي تم تحويره جينياً باستنسال جين هورمون النمو. وفي عام 1983 تمت أول عملية نقل لجنين بشري من رحم أم إلى رحم امرأة أخرى، وتمكن العالم «رالف برنستير» من إنتاج إنثى خنزير لها القدرة على إنتاج هرمون النمو في حليبها، وحدثت أول معضلة قانونية لتقنيات هندسة التكاثر الجديدة في عام 1986 عندما فشلت «ماري بيث» الأم البديلة والملقحة اصطناعياً في محاولتها للاحتفاظ بالطفلة قانونياً. وفي عقد التسعينيات حدثت سلسلة من الخطوات المتلاحقة شملت:

- في عام 1993 : استنسال أول جنين بشري باستخدام تقنيات الانشطار الجنيني.
- في عام 1994 : تمكنت شركتا «سيرونو و اوركانون» من إنتاج الهرمونات المحفزة للإباضة بطرق الهندسة الوراثية.
- في عام 1995 : ولادة أول حملين مستنسلين من خلايا جنينية مشتقة من جنين عمره (9) أيام سمّيا «ميكان» و «موراك» في معهد روزالين/ اسكتلندا.

- ثم في عام 1996 : فقد تم استنسال القرود لأول مرة من خلايا جنينية من قبل العالم «دونالد وولف» من مركز بحوث اوريغون الإقليمي للرئيسيات.

- ثم حدث في عام 1996 : التطور الحقيقي لعملية الاستنسال، إذ نجح العالم «إيان ويلموت» وزملاؤه باستنسال النعجة «دوللي» وسميت باسم المطربة «دوللي بارتون» وأعلن عن ولادتها في شهر شباط 1997 في معهد روزالين/اسكتلندا.

- في عام 1996 : تم الإعلان عن إنتاج البقرة «روزي» التي تحمل مورثات بشرية تشفر لإنتاج حليب مدعوم بأحد الأحماض الأمينية الأساسية.

- في عام 1997 : تبرع ملياردير مجهول بمبلغ 2.3 مليون دولار إلى جامعة (أي.تي.أم) في كوليدج ستيشن/هيوستن) خصصها لأبحاث الاستنسال، وبدأت بعدها شركة «جينيتكس سيفينغس اندكلون جي.اس.سي) تعلن عن دخول سوق استنسال الحيوانات الأليفة كالقطط والكلاب.

- في عام 1997 : تمكن العالمان «توريهيكو وأكياما» و «ريوزو ياناجيماشي» من جامعة هاواي من استنسال فئران إناث.

- في شهر آذار 1997 : أعلن الاتحاد الوطني للجمعيات التعاونية الزراعية الياباني عن تقنية جديدة لإنتاج 200 نسخة متطابقة من العجول.

- في 26 نيسان 1997 : أعلن في سويسرا عن إنشاء أول شركة للاستنسال البشري سميت (شركة المغامرة الشجاعة).

- في 9 تموز 1997 : ولدت النعجة المستنسلة «بوللي» مع أربع نعاج مستنسلة أخرى في معهد روزالين (تم الدمج بين تقنية الاستنسال وتقنية التحوير والتعديل الجيني) وتحمل «بوللي» جينات بشرية تشفر لبروتين الألفا أنتي - تربسين.

- في 26 تموز 1997 : أعلن العالم نيل فيرست من جامعة وسكونسن عن تطوير تقنية جديدة لاستنسال المواشي من خلية ناضجة.

- في شهر آب 1997 : أعلنت شركة (كلوبال أ.ب.س) في ديفورست/وسكنسن عن استنسال عجل أطلق عليه «جين».

- في شهر آذار 1998 : أعلن عن استنسال البقرة «ماركاريتا» في مركز البحوث الزراعية الفرنسي.

ـ في 24 نيسان 1998 : ولد الحمل «بوني» Bonnie وهو أول ولادة ناجحة للنعجة «دوللي».

ـ في 14 أيلول 1998 : تم في اليابان استنسال العجل Y35 من خلية ناضجة انتزعت من أذن ثور من قبل العالم الياباني «تاكاها رويوشيا» من مؤسسة كافغوشيما في جنوب اليابان.

ـ في 30 أيلول 1998 : حصلت مطلقة على أول حكم قضائي بتدمير أجنتها المجمدة.

ـ في شهر كانون أول 1998 : أعلن العالم الكوري الجنوبي «لي يويون» عن نجاحه في استنسال أول جنين بشري مكون من أربع خلايا انطلاقاً من بويضة مفرغة من النواة ونواة من إحدى خلايا المرأة الجسمية؟

ـ في 9 كانون أول 1998 : توصل العالم الياباني «يوكيوكاتو» من معهد العلوم والتكنولوجيا في نارا إلى تقنية استنسال فعالة بنسبة 80 % نجاح، حيث تم استنسال 8 عجول من 10 محاولات.

ـ في كانون الثاني 1999 : أعلن عالم الأحياء «كريغ فنتر» عن نواياه في تخليق جسم عضوي صناعي في المختبر، وأثار إعلانه ضجة كبيرة، ولكن مدير شركة Celleria Genomics أعلن أن الأمر لا يتعلق بتخليق جنس بايولوجي جديد وإنما لتوضيح وتحديد ماهية الحياة.

ـ في 3 آذار 1999 : أعلن عن ولادة الطفل «اليساندرودي غريغوريو» ذو مصدرين وراثيين من الأم وأب واحد في مركز «ارتس» للإخصاب الصناعي في إيطاليا.

ـ في 15 آذار 1999 : صرح «ستيفن هوكينغ» عالم الفيزياء والفلك في جامعة كمبردج «بأنه لا مفر من كائن بشري معدل جينياً ومنقح ومحسن خلال القرون القادمة».

ـ في شهر مايس 1999 : أعلن في اليابان عن استنسال بقرتين من خلايا عائمة في أول إفراز للحليب أنتجته البقرة الأم بعد الولادة دون نزع خلايا من جسم البقرة قد تؤدي إلى مضاعفات.

ـ في 6 مايس 1999 : أعلنت شركة «جيرون» الأمريكية عن اندماجها مع شركة «بي.بي. ال. ثيرابيوتكس» في معهد روزالين.

ـ في 9 مايس 1999 : تمكن العلماء بنجاح من إنتاج ضفادع دون دماغ أو جهاز عصبي، مما يعني إمكانية تربية أعضاء بشرية داخل المختبر (أجنة قطع غيار).

- في 14 مايس 1999 : الملياردير المصري «محمد الفايد» يعلن عن رغبته باستنسال نفسه مئة مرة لإغاضة البريطانيين.
- في 27 مايس 1999 : نجح علماء معهد (MIT) في تنمية أجزاء من يد إنسان بعد نجاحهم في تنمية الأذن والأنف على وسط ساند.
- في 27 مايس 1999 : تم الكشف عن شيخوخة النعجة «دوللي»، حيث اعترف العالم «إيان ويلموت» بأن عمر «دوللي» الحقيقي هو تسع سنوات وهو ذات عمر النعجة الأصلية التي أخذت منها خلية الضرع التي تم استنسالها ونقل نواتها، حيث أظهر الفحص الدقيق أن نهايات الصبغيات في منظومتها الوراثية متقاصرة، وتم الاستنتاج بأن موروث الحيوانات المستنسلة هي من عمر الحيوان الذي استنسلت منه بغض النظر عن الطريقة المستخدمة في الاستنسال.
- في 17 حزيران 1999 : أعلن علماء شركة تقنيات الخلية المتقدمة في ولاية ماساشوستيس عن استنسالهم لجنين ذكر مؤلف من حوالي 400 خلية، ولكنهم أحرقوه بعد يومين، وصرح أحد العلماء بأن الشركة استنسلت أول جنين بشري في شهر تشرين الثاني 1998 وتم حرقه بعد مرور اسبوعين.
- في 19 حزيران 1999 : أعلن عن أول جنين خيمري من البشر والبقر. إذ تم حقن نواة انتزعت من خلية جلد بشرية من الساق في بويضة بقرة مزالة النواة ولكنها لا تزال تحوي دنا مايتوكندريا في السايتوبلازم من أصل بقري.
- في 22 حزيران 1999 : أعلنت صحيفة «تشاينا ديلي» الرسمية الصينية أن علماء صينيين تمكنوا بنجاح من استنسال أول جنين لدب الباندا، حيث تم حقن نواة الخلية الجسمية للباندا في بويضة أرنب، ولكن المشكلة الأساسية تتمثل بإيجاد حيوان مضيف مناسب لاحتضان الجنين، حيث أن أنثى الباندا نادراً ما تكمل فترة الحمل وبسبب اختلاف الحجم وفترة الحمل ولا يمكن بالطبع استخدام أنثى الأرنب في هذه العملية.
- في 27 حزيران 1999 : نجح باحثون كنديون من جامعة اونتاريو في كندا في إنتاج جيل جديد من الخنازير الصديقة للبيئة، حيث تم تحويرها وراثياً بحيث احتوى روثها على كمية أقل من الفسفور بحدود 50% - 20 عن نظيراتها وأطلق على الخنازير المحورة وراثياً أسماء «جاك» و «غوردي» و «واين» وهي أسماء ثلاثة من أشهر لاعبي الهوكي في كندا.

- في 29 حزيران 1999 : نجح العالمان «واكياما وياناجيماشي» من جامعة هاواي ولأول مره في استنسال فأر ذكر سمي بالفأر «فايبرو» نسبة إلى خلايا الفايبروبلاست التي استنسل منها والتي أخذت من ذنب فأر ذكر.

- في 13 تموز 1999: نجح باحثون من آلمانيا والولايات التحدة في استخدام خلايا جذعية جنينية لإصلاح خلل في الدماغ والنخاع الشوكي (خلايا جذعية من أجنة في اليوم الثالث، وزرعت في وسط سهل تحويلها إلى خلايا عصبية).

- في عام 1999 : أعلن الفيزيائي «ريتشارد سيد» عن إنشاء عيادة للاستنسال مقابل ثمن.

- في شهر أيلول 1999 : تمكن العالم «مارك وستهوتسن» في الولايات المتحدة من استنسال عجل من جلد ثور مات قبل سنة وتم الاحتفاظ بخلاياه الجلدية، وبعد محاولات فاشلة نجحت عملية الاستنسال للعجل والذي سمي «فرصة ثانية» Seconed chance .

- في تشرين أول 1999 : تم الإعلان في أحد مواقع شبكة الانترنت عن مزاد لبيع بويضات ملكات جمال وعارضات أزياء جاهزة للإخصاب وبأسعار تتراوح بين 15 ألف - 75 ألف دولار.

- في تشرين أول 1999 : تم شفاء قرود مصابة بمرض باركنسون (عطل إنتاج الدوبامين) بعد زراعة خلايا نسيج عصبي من خنازير سليمة.

- في شهر تشرين أول 1999 : تمكن العالم «فرانسوا بوتيبي» وفريقه البحثي في مركز أبحاث علوم الأحياء والتكاثر في جامعة لافال في كيبك/ كندا، من إنتاج البروتينات العلاجية في كائنات حية أخرى ذات قدرة على إفراز كميات كبيرة من السائل المنوي.

(تنتج الخنازير بحدود 300 مليلتر من السائل المنوي في كل دفقة) أما الفيل فينتج بحدود 3 - 5 ألتار، أما الفئران والتي أنتجت هرمون النمو والعامل الوراثي C12 فتنتج 5 مليغرام/ مل فقط لكل دفقة.

- في شهر كانون أول 1999 : أعلن المكتب العلمي لمعهد الصحة القومي (NHI) الأمريكي مسودة الشروط الواجب توفرها في بحوث الخلايا المأخوذة من أجنة بشرية وبحوث الجينات.

- في شهر كانون أول 1999 : منح مكتب ميونيخ لبراءات الاختراع البراءة لجامعة أدنبرة وكانت تبحث في تغيير الخلايا والأجنة البشرية.

- في 16 كانون الثاني 2000 : أعلن في إسبانيا عن انقراض سلالة نادرة من الماعز الجبلي ولكن العلماء أخذوا عينة نسيجية من الأنثى الوحيدة التي كانت على قيد الحياة لغرض استنسالها.

- في 27 كانون الثاني 2000 : نجح فريق بحثي ياباني بقيادة العالمان «تاكاهارو يوشيا» و «نوريو تابارا» في تقنية إعادة الاستنسال، حيث نجحوا في استنسال عجل من إذن عجل مستنسل ولأول مرة على مستوى الحيوانات الاقتصادية الكبيرة (تم استنسال فئران من فئران مستنسلة) ويمكن أن توفر العجول المستنسلة معلومات عن معدل الحياة والشيخوخة.

- في كانون الثاني 2000 : تمكن العالم «توبوكو أوشيدا» من شركة الخلايا الجذعية Stem Cell Co. من عزل خلايا دماغية بشرية لأول مرة، حيث تم زراعة الخلايا في أدمغة الفئران، حيث تطورت إلى خلايا عصبية متخصصة.

- في 2 شباط 2000 : اكتشف علماء فرنسيين أن السكر تريهالوز قادر على حفظ الخلايا المجففة وإعادتها للحياة بعد أيام ومن دون آثار سلبية، حيث يحيط السكر بالجزيئات الكبيرة مشكلاً غطاء عازلاً عند جفاف الماء ويتطلب استخدام هذا السكر في حفظ الخلايا البشرية إيجاد وسيلة أنزيمية لنقل هذا السكر عبر غلاف الخلية لحفظ نواتها.

- في 27 شباط 2000 : احتجت وزيرة الصحة الألمانية على منح مكتب ميونيخ لبراءات الاختراع (البراءة لجامعة أدنبرة) التي قدمت بحثاً يخص تغيير خلايا وأجنة بشرية وتتضمن طرقاً علمية لإنتاج إنسان معدل جينياً.

- في 7 آذار 2000 : نجح العالم الياباني «كييا سوميزوكامي» من مركز اساهكياوا الطبي في زرع مبايض بشرية في الفئران مما جعلها قادرة على إنتاج بويضات بشرية، وتمت التجربة بأخذ مبايض من ثلاث نساء أمريكيات يعانين من أمراض في الرحم، حيث تم استئصال المبايض وتقطيعها إلى قطع مربعة لا تتجاوز عرضها مليمترين، حيث تم زرع ما مجموعه 108 منها إضافة إلى خلايا بشرية كامنة القدرة لها القدرة على النمو والتخصص والتحول إلى خلايا بيوض بشرية وتمت عملية الزرع تحت الجلد لبطن الفئران والتي يمكن تحفيزها هرمونياً لتسريع نمو الأنسجة المغروسة والتي تحولت إلى خلايا ركمية بعد اسبوعين.

ـ في 16 آذار 2000 : أعلنت شركة P.P.L.Theraputics عن ميلاد 5 خنازير مستنسلة وهي سابقة تحدث لأول مرة حسب تعبير الشركة ويمكن أن تؤدي دوراً مهماً في تزويد الإنسان بأعضاء الخنازير (تمت عملية الاستنسال بالنقل النووي) وإن الشركة سوف تغطي جزء من السوق الواسعة لتجارة الأعضاء البالغة بحدود 6 مليار دولار خصوصاً بعد التغلب على مشكلة رفض الأعضاء المغروسة بإنتاج خنازير ذات خلايا خاملة جينياً ومناعياً.

ـ في 5 نيسان 2000 أوصت الهيئة الاستشارية للأخلاقيات الطبية البريطانية باستنسال الأجنة لأغراض علاجية وقد اتفق هذا الموقف مع موقف الجمعية الملكية البريطانية التي أعلنت أيضاً تأييدها لتعديل القوانين المتعلقة ببحوث الأجنة، ومنها قانون صدر في عام 1990 حول الخصوبة وعلم الأجنة والذي يجيز إجراء البحوث حول الأجنة البشرية ولغاية اليوم الرابع عشر فقط ولا يتضمن مفردة الاستنسال أو الاستنسال العلاجي.

ـ وفي 5 نيسان 2000 : أعلن العلماء في أستراليا عن نجاحهم في تطوير الخلايا العصبية المشتقة من الأجنة البشرية، حيث تمكنوا من تطوير الخلايا العصبية المشتقة من أعصاب ساق الجنين لغرض استخدامها في علاج مرض الشلل الارتعاشي «باركنسون».

ـ أما في 20 مايس 2000 : فقد أعلن عن نجاح علماء جامعة ميشغان في التوصل إلى تقنية زرع جيدة أمكن من خلالها إنتاج عظام بما تحتويه من غلاف خارجي صلب والنخاع الإسفنجي، حيث تم أخذ عينة من نسيج الجلد في الجرذان وزراعتها في المختبر ومن ثم تحوير وتعديل الخلايا لإنتاج مادة بي أم بي 7 البروتينية، فتم الحصول على عظام هجينية خلاياها من الجرذان والإنسان.

ـ وفي 20 حزيران 2000 : أعلن عن ميلاد ماعز مستنسلة من خلايا بالغة في الصين ولكنها سرعان ما نفقت بعد أن واجهت مشاكل في الجهاز التنفسي، وفي 23 حزيران 2000 أعلن عن ولادة ماعز أخرى أطلق عليها اسم «يانغيانغ» وتزن 2.6 كيلوغرام وبطول 33.5 سم، وتم الاستنسال باستخدام تقنية مختلفة عن تلك التي استخدمت في استنسال «دوللي»، إذ اعتمدت التقنية الصينية في الاستنسال على أخذ خلايا من أذن ماعز بالغة وبويضات غير ناضجة من ماعز مذبوحة.

الفصل الثالث

تقنيات التطويع المجهري
و
الاندماج الكهربائي

3 - التقنيات التحضيرية في التطويع المجهري

Preparative techniques in Micromanipulation

حقق التطويع المجهري نتائج مذهلة في مجال الاستنسال البايولوجي والتحوير الجيني للخلايا الحية، وتعود تقنيات التطويع المجهري إلى القرن التاسع عشر وتحديداً إلى عام 1859 م، إذ استخدم العالم شمدت (H.D. SChmidt) ولأول مرة في هذا العام المشراح المجهري Microscopic dissector، ومنذ ذلك الحين اكتسبت تقنيات التطويع المجهري وبصورة متزايدة الكثير من الأهمية والتكامل من خلال التطوير المستمر للأدوات المجهرية الحساسة والدقيقة، ولغرض التوصل إلى مفهوم أكثر عمقاً وشمولية لهذا المجال الحساس من التقنيات المجهرية، لا بد من وضع تعريف دقيق لمصطلح التطويع المجهري Micromanipulation، حيث يستخدم هذا المصطلح ليتضمن كل التقنيات والعمليات التي يتم إنجازها في مجال الرؤيا في الحقل المجهري سواء تم التطويع للخلايا الحية باستخدام وسائل بسيطة أو بمساعدة أجهزة أو وسائل غاية في التعقيد.

إن التقييم الكامل والواضح للفوائد التي يتم الحصول عليها من تقنيات التطويع المجهري يجب أن تأخذ بنظر الاعتبار العديد من العمليات الدقيقة التي يمكن إجراؤها بمعزل عن استخدام اليد البشرية ولكن بمساعدة العين من خلال التكبير البصري والذي يعطي فهماً دقيقاً وصورة محددة لنقطة الأداء Tool point والجسم object . وبين عامي 1904 و 1914 طوّر العالم باربر (M.A.Barber) حاملاً لماصة آلية Mechanical pipette holder وأسلوب خاص لعزل الأحياء المجهرية من خلال تطويع الماصة الدقيقة Micropipette في قطرة معلقة من تحت سطح لشريحة غطاء معلقة فوق حجر رطبة، وبذلك نجح في ابتكار أسلوب جديد يمكن من خلاله الحد من جميع العوائق والعقبات بين العينة والعدسة الشيئية ويسمح باستخدام قوة تكبير أعلى.

أدى التطور الكبير في تصميم المجاهر واستخدام المجهر المعكوس أو المقلوب Inverted Microscope فإن عمليات التطويع المجهري أمكن استخدامها بصورة مناسبة في قطرات موضوعة في أطباق بتري أو على شريحة مجهرية موضوعة على مسرح المجهر

Microscopic Stage وبسبب عكوسية المجهر فإن العدسة الشيئية تحتل موقعاً تحت الطبق أو الشريحة، في حين تتموضع القطرات السائلة فوقه وهذا يتيح ملاحظة ملائمة لكافة أرجاء الحقل المجهري، وهذا الوضع يتيح أيضاً استخدام الأدوات الدقيقة العاملة Operat ing microtools ذات القمة المنحنية بزاوية أفقية وأن تصل إلى العينة من الأعلى، ومن الفوائد الأخرى للمجهر المعكوس هو إمكانية استخدام قطرة أكبر حجماً والتي يمكن تغطيتها بزيت البارافين لتقليل تأثير التبخر، وحيث أن العينة تستقر على السطح العلوي لطبق بتري الساند أو الشريحة المجهرية مما يجعل التطويع المجهري أكثر سهولة.

أثبت التطويع المجهري الحيوي أهمية عظيمة ومتنامية في العديد من مجالات علوم الحياة المختلفة كعلم الأجنة وعلم فسلجة الخلية وعلم البكتريا وعلم الخلية التجريبي، وفي مجال هندسة التكاثر استخدمت تقنيات متعددة شملت تقنية إمناء المنطقة (Subzonal Insemination (SUZI وتقنية تشريح المنطقة الجزيئي Partial Zona dissection وتقنية كسر أو صدع الزونا Zona breaching والتقنيات الأخرى والتي تستخدم الآن في التجارب أو الاختبارات السريرية لتقنيات التكاثر البشري وفي الاستخدامات السريرية في التشخيص السابق للغرس Pre - implantation diagnosis للاعتلالات الوراثية المرتبطة بالكروموسومات، ويعتمد اختيار التقنية والأسلوب المناسب على نوع المشكلة المطلوب بحثها.

3- 1 - 2 تطبيقات التطويع المجهري:

تتباين وتتنوع تطبيقات التطويع المجهري لتشمل عدد كبير من المجالات المختلفة كالدراسات النووية والبحث على أشكال قيمة في الفن وفي فن التصميم وفي الدراسات المتعلقة بتلوث الهواء والتلقيح الاصطناعي Artificial Insemination ، وعموماً يمكن وضع هذه التطبيقات ضمن المجالات العامة الآتية:

1 - تحضير العينات من المواد غير الحية Non Biological Material .

2 - التجريب الكيميائي Chemical Experimentation .

3 - التطويع والتعامل مع الخلايا الحية والأنسجة.

3 - 1 - 3 الجراحة المجهرية لأجنة الحيوانات الكبيرة:

اكتسب التطويع المجهري لأجنة الحيوانات الكبيرة أهمية كبيرة ونال اهتماماً واسعاً بين الباحثين ومنتجي الحيوانات الاقتصادية، إذ تغير المفهوم الذي كان سائداً حتى عقد السبعينيات من القرن المنصرم بعدم قدرة أجنة الحيوانات المزرعة (على عكس أجنة الحيوانات المختبرية) على البقاء والنجاة وإنتاج زريعات أو غرسات Transplant عقب تعرضها لتقنيات التطويع المجهري، إذ أثبتت الدراسات اللاحقة وفي عقد الثمانينيات تحديداً أن التويتة Morula والكيس الأريمي Blastocyst لأنواع حيوانات المزرعة يمكنها البقاء والحياة عقب الجراحة المجهرية ويمكنها التطور لاحقاً داخل الرحم In Utero منتجة ذرية offspring حية (عيوشة) Viable من إناث حاضنات بديلة Surrogate females. وتم تطوير مجموعة من تقنيات الجراحة المجهرية المتقدمة والتي تستخدم الآن بصورة روتينية في مختبرات غرسات الحيوانات التجارية ومنها:

1 - التشريح المنطقي الجزئي لإخصاب أنابيب الاختبار Partial Zona dissection for in vitro Fertilisation (IVF).

2 - أسلوب نقل كتلة الخلايا الداخلية Inner cell mass Transfer .

3 - أسلوب إنتاج أجنة كيمَرية Chimaeric Embryos للاستخدام المحتمل في الإنتاج الحيواني مستقبلاً.

أجريت الدراسات على التطويع المجهري لأجنة اللبائن وتقييم القابلية على التطور لقسيمات أرومية مفردة معزولة من الأطوار المبكرة لأجنة الأرانب في عام 1936 من قبل العالم (G. Pincus) وفي عام 1942 تم إجراء التطويع المجهري لأجنة الجرذان من قبل العالمان نكولاس وهال (G.S.Nicholas and B.V.Hall) في حين تأخر تطويع أجنة الفئران مجهرياً لغاية 1959 والذي تم إجراؤه من قبل العالم تاركويسكي (AK.Tarkowski) وبينت هذه الدراسات اللاحقة أن القسيم الأرومي المفرد للأطوار الجنينية المبكرة للبائن (التي هي أصغر أو مساوية لثمان خلايا) كان كامناً (وافر الجهد أو الفعالية) Totipotent مع وجود احتمالية قائمة لإنتاج ذرية متعددة من جنين واحد، ولكن العقبة الرئيسية كانت تتمثل بانعدام القدرة على إعادة تضام Recompaction أطوار الجنين للبقاء داخل الحي in vivo في حالة إصابة الغطاء الواقي للبيضة (ZP) Zona Pel-

lucida بضرر جـزئي أو كلي، وقد تم تجاوز هذه العـقبة الكبـيرة من خلال نجـاح العالم ويلادسن (S.M.Willadsen) ، في عـام 1979 في تطويـر تقنيـة الـطمـر بالـهـلام Agar Embedding Techniques وتضـمن الأسلوب فـصل القسـيمات الأرومـيـة في الأطوار الجنينية المبكرة بالجراحة المجهرية ونقل واحد أو أكثـر من القسيمات الأرومية من أحد هذه الأجنة إلى الأغطيـة الواقيـة للبيضـة والمفرغـة (Evacuated (ZP ثم تطمـر القسـيمـات الأرومية المفصولة والمحتواة ضمن الأغطية الواقية البديلة (الحاضنة) (Surrogate (ZP في الهلام Agar Chips ، ثم تنقل هذه القسيـمات الأرومية المطمورة بالهـلام إلى أقنية البيض اللاحـمة ligated oviducts لنعـاج في الدورة الشبـقيـة، لكي تسـتمـر في نموها وتطورها اللاحق داخل الحي. وبعـد وصول الأجنـة إلى طور التويتـة أو طور الكيـسة الأديمية يتم استرداد الأجنة المطوعة مـجهرياً من المضيف الوسطي Intermediate Host وإزالتها بعناية من الهلام ونقلهـا إلى المستلمـات ذات الخصوصـية لإكمـال تطورها، حيث استـخدم هذا الأسلوب في إنتاج أول مجموعة من توائم الحملان المتماثلة من أجنة ذوات ثماني خلايا، واستخدام هذا المنهج التـقني فيما بعد لإنتاج التوائم المتـماثلة الأولى من العجول Calves ومـجمـوعة من توائم من أجنـة بقرية في اليـوم الخامس إلـى اليوم السـادس وبطرق غيـر جراحية.

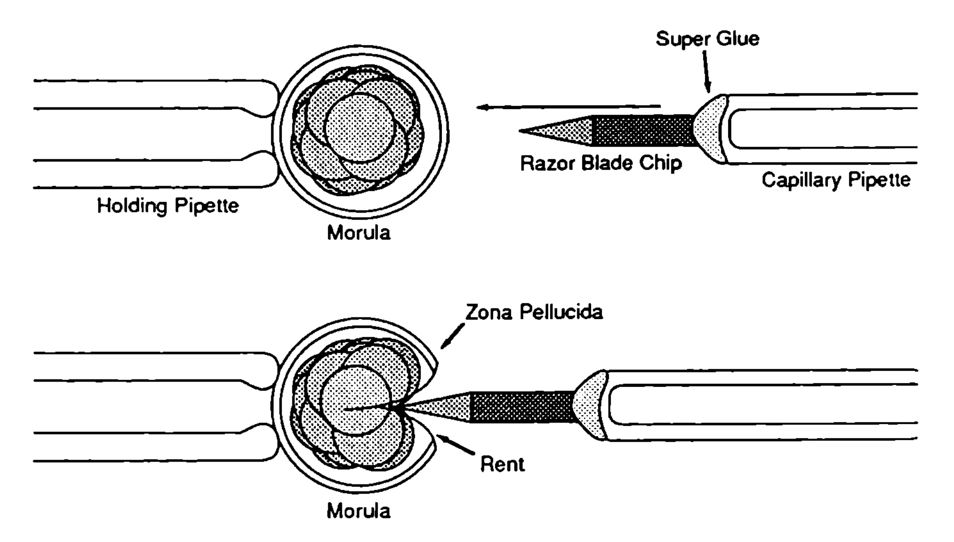
3 - 1 - 4 تصنيف وشطر الأجنة لإنتاج التوائم:

Embryo bisection to Produce twins

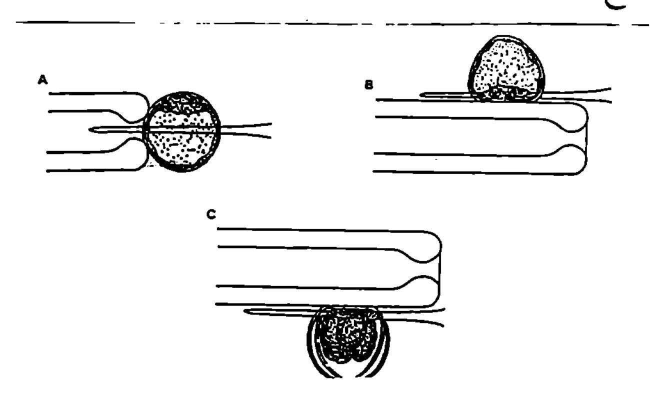
تعد تقنية الطمر بالهلام من الطرق الممتازة للتطويع المجهري وكوسط زرعي للأطوار المبكرة من الأجنة وبالرغم من المزايا القـيمة لهـذا الأسلوب فإن أغلب البـاحـثين لا يعدون هذا الأسلوب عمليـاً بما فيه الكفـاية للاستخـدام الروتيني في مراكـز غرس ونقل الأجنة. وفي العام 1982 تمكنت ثلاث مجاميع بحثية مستـقلة، كل على حدة من تطوير أساليب وتقنيات جديدة للتطويع المجهري، حيث وصف البـاحث أوزل (Ozil) وجماعته من فرنسا تقنية لإنتاج أجنة (مشطـورة) باستخدام إبرتين زجاجية مجـهرية، ويتم فتح الغطاء الواقي للبيضـة (ZP) وإزالة كتلة الخلايا الجنينية من تجويف الـ (Zona) باستخدام مـاصة زجاجية ناقلة Glass transfer pipette ومن ثم شطر الجـنين الخـال من الغطاء الواقي بـاسـتـخـدام مشـرط أو مبـضع وإحلال الأنصـاف في أغطيـة واقية مـفرغـة باستـخدام الماصـة الناقلة، وباستخدام هذه التقنية فإن 14 من الكيسات الأريمية المبكرة تم شطرها ونقلـها بصورة غير

جراحية إلى 14 من الحيوانات المستلمة منتجة نسبة حمل بلغت 64.2 % ونسبة توأمة بلغت 66.6 % ، وفي العام ذاته (1982) نشر مجموعة من الباحثين من جامعة لويزيانا الحكومية (LSU) أسلوباً آخر لشطر الأجنة البقرية التي تم جمعها بطرق غير جراحية، وباستخدام إبرة مجهرية دقيقة لعمل شق أو مزقة Rent في الغطاء الواقي (ZP) وإزالة كتلة الخلايا الجنينية باستخدام الإبرة الزجاجية المرنة، حيث يتم تصنيفها وشطرها على صفيحة شاقولية مستقرة في قعر طبق بتري Petri dish، يعقبها نقل كل نصف جنين (demi - embryo) إلى أغطية واقية مفرغة، وباستخدام هذا الأسلوب تم نقل ثمان أزواج من أنصاف الأجنة وستة أنصاف أجنة مفردة ونقلت بصورة غير جراحية إلى 14 من الأبقار المستلمة وأظهرت أنصاف الأجنة التوأمية المنقولة نسبة حمل بلغت 62.5% ، أما أنصاف الأجنة الفردية المنقولة فقد أنتجت نسبة حمل بلغت 16.6% ، وحقق الباحث وليامس (Williams) وجماعته من جامعة كولورادوا الحكومية (CSU) نجاحاً في استنباط أسلوب تقني جديد في شق الأجنة البقرية المحتواة ضمن الغطاء الواقي للبيضة (ZP) باستخدام رقاقة نصل الموس Razor blade chip (الشكل 3 - 1) والمثبت بصمغ قوي Super glue على ماصة زجاجية شعرية صغيرة .Glass Capillary Pipette لشطر وتنصيف الجنين السليم الكامل، تنقل بعدها أنصاف الأجنة (demi - embryo) وباستخدام ماصة زجاجية دقيقة إلى أغطية واقية (ZP) مفرغة، وباستخدام هذه التقنية تم شطر 20 جنيناً بقرياً ذا مواصفات جيدة (بعضها في طور التويتة وبعضها يعود إلى طور الكيس الأريمي المبكر) ونقلت هذه الأجنة كأزواج أنصاف أجنة أما بطريقة جراحية أو غير جراحية إلى 20 من الماشية المستلمة وأسفر 14 من عمليات النقل الجراحي و 6 من عمليات النقل اللاجراحي لأنصاف الأجنة عن نسب حمل بلغت 64% و 17% على التوالي، ونظراً لبساطة هذا الأسلوب فقد تم تبنيه من قبل مراكز ووحدات غرس الأجنة التجارية.

تعد الأساليب الثلاثة آنفة الذكر من الأساليب الكفوءة لتصنيف أجنة حيوانات المزرعة وإنتاج ذرية حية من أشقاق الأجنة ومن الأساليب الأخرى المبسطة لتصنيف الأجنة والقابلة للتطبيق بسهولة هي تقنية تنصيف الطور الجنيني لمبكر (الكيس الأريمي) إلى جزئين باستخدام إبرة زجاجية دقيقة للقطع خلال كتلة الخلايا الداخلية (الشكل3-2) وأثبت الأسلوب كفاءة جيدة، إذ بلغت نسبة الحمل لأنصاف الأجنة المنقولة بحدود 89% .



الشكل (3-1): التنصيف الثنائي للتويتة، يتم تنصيف طور التويتة الجنيني ثنائياً إلى جزئين باستخدام رقاقة نصل الموس Razor Blade chip المتصلة بماصة شعرية زجاجية باستخدام التثبيت بالصمغ.



الشكل (3-2) : تنصيف الطور الجنيني المبكر (الكيس الأريمي) إلى جزئين باستخدام إبرة زجاجية دقيقة للقطع خلال كتلة الخلايا الداخلية وباستخدام الجدار الخارجي للماصة الزجاجية الداعمة.

وفي مختبرات جامعة ولاية لويزيانا (LSU) تمكن الباحث روري (R.W.Rorie) في عام 1986 من تطوير تقنية فعالة لا تعتمد على استخدام أجهزة ووحدات التطويع المجهري التجاري في التنصيف السريع للجنين الكامل ويعتمد الأسلوب على وضع الجنين الكامل في قطرة مجهرية microdrop من الوسط الحامل في شريحة مجهرية وباستخدام نصل شفرة الموس Razor blade الممسوكة بزوج من المرقآت (قاطعة النزيف)، حيث يتم تنصيف الأجنة، وبينت النتائج أن نسبة عالية من الأجنة البقرية السليمة بلغت بحدود 98% تم تنصيفها بنجاح باستخدام هذا الأسلوب، ويعد هذا الأسلوب من الأساليب سهلة التطبيق والتعلم وغير المكلفة.

3 - 1 - 5 نسبة الحمل من الأجنة المنصفة:

توجهت جهود الباحثين في السنوات الأخيرة نحو تحديد العوامل المساهمة في نسبة الحمل المثلى من الأجنة المنصفة، ومن هذه العوامل هي نوعية الأجنة، إذ بينت النتائج أن نقل أنصاف الأجنة demi - embryos الناتجة من أجنة ذات نوعية ممتازة أو جيدة. أظهرت نسبة حمل مماثلة لتلك المستحصل عليها من الأجنة السليمة ذات النوعية المماثلة.

إن نسبة الحمل المتوقعة من أنصاف الأجنة المفردة المغروسة لا جراحياً في إناث بقرية مفردة مستلمة عادة ما تتراوح بين 45 - 65 %، أما العامل المهم الآخر في نسبة الحمل المثلى فهو طور النمو الجنيني، حيث وجد أن نسبة الحمل لأنصاف الأجنة الناتجة عن طور التويتة المبكر كان أوطأ بصورة معنوية عنها في نسبة الحمل الناتجة عن أنصاف الأجنة الناتجة عن طور الكيسة الأريمية المبكر ولا يملك الغطاء الواقي للبيضة (ZP) تأثيراً محسوساً على بقائية أنصاف الأجنة داخل الحي، وإن نجاحاً مماثلاً قد تم تحقيقه سواء وضعت أنصاف الأجنة في غطاء واقي أصلي Orginal ZP أو غريب Foreign Zp.

على الرغم من وجود إشارات أخرى نحو أفضلية الأول وبنسبة 74 % عنه في الغطاء الواقي الغريب أو البديل، إن أعلى نسبة للتوأمة والحمل، تم الحصول عليها عندما نقلت أنصاف الأجنة بصورة أزواج Pairs بدلاً من نقلها بصورة مفردة Single إلى الإناث المستلمة، وكان معدل الحمل الذي تم تسجيله مماثلاً عند نقل أزواج أنصاف الأجنة إلى نفس البوق الرحمي Uterine horn ، أو عندما ينقل أحد أنصاف الأجنة إلى كل واحد من الأبواق الرحمية للماشية المستلمة، وبينت الدراسات أن بقائية غير متوقعة

في الرحم تكون مصاحبة للأجنة البقرية المشطورة إلى أرباع . من أجنة قبل مرحلة التضام أو الدمج Pre compaction أو بعدها Post Compaction مما يشير إلى أن أرباع الأجنة هي أقل قدرة على إنتاج إشارة كافية من التغذية اللوتينية Luteotrophic داخل الرحم لمنع تحوف الأصفري Luteal Regression في الإناث المستلمة، وقد تعود البقائية المنخفضة لهذه الأرباع إلى افتقادها لخلايا جنينية كافية في كتلة خلاياها الداخلية (ICM) لتكوين أجنة حية.

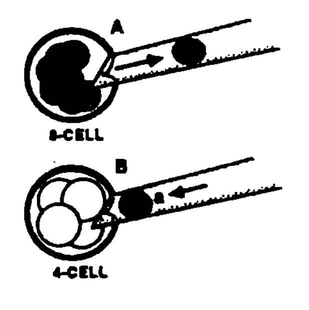
3 - 1 - 6 نقل كتلة الخلايا الداخلية :

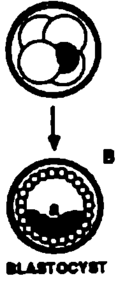
تعد القدرة على نقل الأجنة بين الأنواع المتقاربة أحد الأساليب المهمة لإنقاذ الأنواع المعرضة للانقراض، وفي عقد الثمانينيات تمكن العلماء وبنجاح في نقل الأجنة من أحد الأنواع النادرة Exotic Species إلى نوع آخر بديل سائد Abundant Surrogate Species وفي عام 1984 نجح الباحث دريسير Dresser في عملية النقل الجنيني من حيوان بقر الوحش Bongo antelope واسمه العلمي Tragelaphus euryceros إلى حيوان العلند الأفريقي (ظبي أفريقي ضخم) African eland واسمه العلمي Tragelaphus oryx وبرهنت هذه التقنية على إمكانية تحقيق زيادة سريعة في الحيوانات النادرة كواهب للأجنة وبالاعتماد على الحيوانات الأكثر شيوعاً والعائد لذات الجنس أو ذات الصلة القريبة كمستلمات لهذه الأجنة، وفي حالة الحمل وذلك لوجود اختلافات في المورفولوجيا المشيمية أو وجود مشاكل في التوافق المناعي، وفي مثل هذه الحالات، يمكن استخدام تقنية إعادة بناء وتكوين الأجنة بالجراحة المجهرية Microsurgical Embryo Reconstruc tion Technique.

يعود تاريخ تطوير تقنية نقل الخلايا الجنينية بالجراحة المجهرة لحيوانات المزرعة إلى عام 1980 ، وتعتمد التقنية على فصل القسيمات الأرومية Blastomere ونقل الخلايا إلى جنين غير متواقت Asynchronous embryo يعود لذات النوع، وإذا ما تم ذلك بنجاح باستخدام الحقن المجهري Microingection أو الجراحة المجهرية فإن الجنين المتبرع أو الواهب المشتق من واحد أو أكثر من القسيمات الأرومية النامية سوف تتطور طبيعياً في الرحم عندما تنقل إلى أنثى مستلمة.

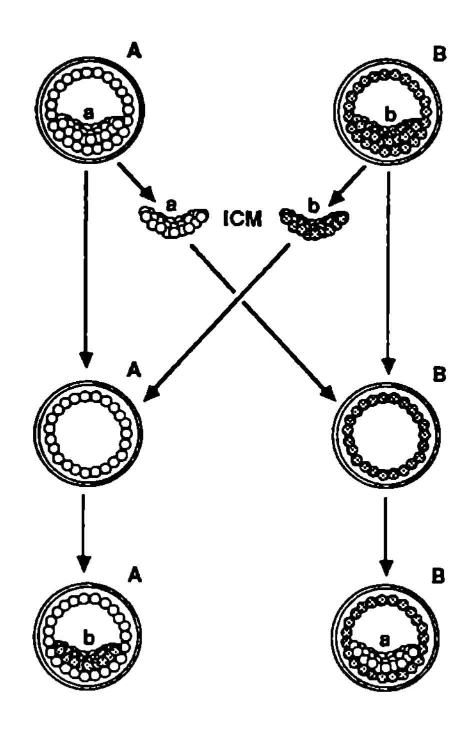
إن روعة هذه التقنية للتطويع المجهري تتمثل بامتلاك الأجنة المحولة جراحياً لأغشية ـمية من طبقة التروفواكتوديرم لـلجنين الثاني أما الجنين ذاته فسوف ينمو من كتلة الخلايا ـجنين الأول (الشكل 3 - 3) وهذا يسمح بإعادة أو تشكيل الجنين لتوضع في إناث ـستلمة لجنين ثاني من النمط الاستيلادي breed type أو لنوع آخر.

ومن المناهج التقنية الأخرى هي التقنية التي تتضمن إزالة كتلة الخلايا الداخلية من جنين في مرحلة الكيس الأرومي للنوع الواهب ووضع هذه الكتلة الخلوية في كيس أريمي ـنوع المستلم والذي أزيلت كتلته الخلوية الداخلية (الشكل3 - 4) وبذلك ستمتلك الأجنة ـنقولة إليها كتلة الخلايا الداخلية أنسجة مشيمية ذات خواص متطابقة لتلك الموجودة في ـحيوان المستلم، والجنين المتطور ضمن الأمنيون amnion سيكون من النوع الواهب، حيث أنه يكون بالأصل من كتلة الخلايا الداخلية المغروسة.





الشكل (3 - 3) : أسلوب إعادة تكوين وبناء الجنين باستخدام النقل غير المتواقت للقسيم الأرومي من جنين ذو 8 خلايا إلى جنين ذو 4 خلايا، والنمو الأكثر أهمية للقسيم الأرومي يعود لمساهمة كتلة الخلايا الداخلية.



الشكل (3 - 4) : أسلوب نقل كـتلة الخلايا الداخليـة (ICM)، حـيث يتم نقل كـتلتين من هذه الخلايا (b , a) من جنينين مـختلفين في طور الكيـسة الأريمـية (B, A)، حـيث يتم تبادل هذه الكتلة من الخلايا بين الجنينين باستخدام تقنيات الجراحة المجهرية.

إن المثال الجيد على هذه الحـالة هو استخدام الخراف والماعز كإناث مـتبرعة بالأجنة، فحين تنقل أجنة الخراف إلى أنثى ماعز مسـتلمة أو العكس أي حينما ينقل جنين ماعز إلى أنثى خروف (نعجة) مستلمـة، فإن الأجنة المغروسة لا تتطور إلى نهاية الحمل، ولكن في حالة إزالة (ICM) لجنين الخراف بالجـراحة المجهرية وتوضع في جنين الماعـز المزالة منها الـ (ICM) الخاص بـها فإن الجنـين المعاد تشكيله يمكن غـرسه ونقله إلى أنـثى ماعـز مستلـمة ويؤدي ذلك إلى زيادة احتمالية الحصول على ذرية وليدة وذلك لأن الأغشية المشيمية لهذا الجنين سوف تـشتق من جنين الماعـز الأصلي، والنتيـجة النهائـية ستكون نقـلاً بين الأنواع لجنينين، حـيث تلد أنثى الماعز حـملان والنعـاج سوف تلد ذرية من الماعـز، وبذلك يمكن تطبيق هذه التقنية في إنقاذ الأنواع الأخرى المهددة بالإنقراض.

3 - 1 - 7 نقل الأجنة Embryo transfer :

يتم في هذه التقنية عزل البيوض المخصبة من الحيوانات الواهبة (Donores) وزرعها في الحيوانات المستقبلة (Recipient) لكي تحضن فيها لحين الولادة بعدأن يتم استخدام الهرمونات لغرض إيصال الحيوانات الواهبة والمستقبلة إلى مستوى واحد من الدورة التكاثرية وتساهم هذه التقنية بشكل فعال في زيادة الإنتاجية كماً ونوعاً، ولغرض الحصول على عدة أجنة من حيوان واهب واحد، حيث يمكن نقل بعضها إلى الحيوان المستقبل والباقي يمكن حفظه باستخدام التجميد، ولتجميد الأجنة العديد من الفوائد والتي تشمل السيطرة والحد من حالات انخفاض الخصوبة ورخص كلفة نقل الأجنة، ويمكن أن تتم عملية نقل الأجنة بإجراء عملية جراحية أو باستخدام الطريقة غير الجراحية عن طريق غسل الجهاز التناسلي للأبقار والحصول على الأجنة ومن ثم نقلها إلى الحيوانات المستقبلة.

وتشكل مبايض الحيوانات الذبوحة في المجازر مصدراً رخيصاً لتجهيز البويضات وبكميات كبيرة ومصدراً لإجراء البحوث بعد إنضاجها وإخصابها في المختبر لاستخدامها في مشاريع نقل الأجنة وخاصة لغرض إنتاج التوائم في أبقار اللحم، وفي عام 1983 تم إنتاج أكثر من 60.000 حيوان بطريقة نقل الأجنة في الولايات المتحدة وحدها. ولغرض المحافظة على الأجنة في عمليات النقل بعيد الأمد ولمسافات طويلة فيمكن نقل هذه الأجنة داخل أرحام حيوانات حية أخرى فقد أجريت اختبارات تم فيها نقل قطيع كامل من أجنة الماشية عبر المحيط الأطلسي داخل رحم أرنب حي «الأرنب هو الحيوان أو المضيف المثالي» وعند الوصول، تم استخراج هذه الأجنة من رحم أرنب وغرست بنجاح في أمهات «أبقار» بدائل والتي ولدتها فيما بعد عجولاً طبيعية وذات نمو ،ونشاط جنسي طبيعي.

وكان قد تم في آواخر عام 1978 تجميد عدد من أجنة الفئران وكان بعض هذه الأجنة محفوظاً بدرجة حرارة 452 مْ تحت الصفر، ثم أذيب عنها الجليد وغرست بنجاح في أمهات بدائل.

3 - 2 تقنيات التثقيب والاندماج الكهربائي :

تعد هذه التقنية جزءاً من التقنيات الحديثة التي تعود إلى علم مستقل يعرف باسم الكيمياء الكهربائية الحيوية Bioelectro chemistry أو كيمياء الفيزياء الحيوية Biophysical chemistry وتشمل التطبيقات المتقدمة لهذه المجالات العلمية.

1 - التثقيب الكهربائي Electroporation : وفيه تستخدم النبضات الكهربائية لتكوين ثقوب في الأغشية الحيوية يمكن من خلالها إدخال شدف الدنا إلى داخل الخلايا وإجراء التحول الكهربائي Electrotransformation.

2 - التحييد الكهربائي Electrocuring : وفيه يتم استخدام التيار الكهربائي للتخلص من البلازميدات البكتيرية.

3 - التحرر الكهربائي لمحتويات الخلية Electrorelease : وفيه يتم استخدام التيار الكهربائي في عملية تحرير محتويات الخلية إلى الخارج عبر الأغشية الحيوية.

4 - التنبيغ (الاستيعاب الاندماجي) الكهربائي Electrotransfection : وفيه يستخدم التيار الكهربائي في تنبيغ الخلايا كهربائياً.

5 - التحفيز الكهربائي Electrostimulation : وفيه يستخدم التيار الكهربائي في تحفيز نمو وتضاعف الخلايا.

6 - الإدغام الكهربائي Electroinsertion : وفيه يتم إدغام البروتينات داخل أغشية الخلايا كهربائياً.

7 - الاندماج الكهربائي Electrofusion : وفيه يتم استخدام التيار الكهربائي في تحقيق الاندماج بين خليتين كاستخدامها في تحقيق الاندماج الكهربائي بين الخلية الجسمية والبيضة منزوعة النواة.

تم إنتاج أنواع مختلفة من الأجهزة المناسبة لإجراء عملية التثقيب الكهربائي مثل جهاز النابض الجيني Gene Pulser المنتج من شركة Bio - RAD الشكل (3 - 5).

تؤثر العديد من العوامل على نجاح عملية التثقيب الكهربائي ومنها الداريء Buffer المستخدم في عملية التثقيب والاندماج لأن العملية تؤدي إلى تكوين حرارة عالية والتي تؤثر بدورها على بقائية الخلايا.

ومن ميزات الدواريء المستخدمة هي امتلاكها لقوة أيونية ضعيفة , NH_4^+ , Na^+ Mg^{++}، حيث إن الأيونات تؤدي إلى زيادة التوصيل الكهربائي إلى الحد الأعلى الذي لا يمكن أن تتحمله الخلايا الحية وعادة ما تحتوي الدواريء على 10% من الكليسرول لتوفير حماية لهذه الخلايا.

تقاس قوة الحقل الكهربائي Field Strength بالفولت/ سنتمتر، والأخيرة تمثل قياس الفسحة أو الفجوة gap بين الإلكترودات في الحاوية (الكيوفيت).

تتباين مقدار قوة الحقل الكهربائي المستخدمة اعتماداً على نوع الخلايا الحية (الجدول 3 - 1) ففي البكتريا تتراوح بين 6.25 - 16 وقد تصل إلى 25 كيلو فولت/ سم (لا تظهر القيمة الأخيرة في الجدول) وبطول نبضة لحد 5 ملي ثانية (milliseconds) أي 5 بالألف من الثانية.

أما خلايا اللبائن فتتطلب فولتية أوطأ بكثير وعادة ما تتراوح لأغراض التحول الوراثي من 350 - 650 فولت/ سنتيمتر ولمدة زمنية تتراوح ما بين 5 - 25 ملي ثانية وحسب نوع الخلية.

ومن العوامل المؤثرة الأخرى هي درجة الحرارة والتي يجب أن تكون واطئة من 0 - 4 م°. إذ تهبط كفاءة عملية التحول بحدود 100 ضعف إذا ما أجريت في درجة حرارة الغرفة.

ومن العوامل المؤثرة الحرجة هي حيث يجب أن تكون كثافة الخلايا أقل بكثير من 1- 2×10^6 خلية/ مل في حالة إجراء تجارب التحول الكهربائي وعلى النقيض من ذلك في حالة إجراء تجارب الاندماج الكهربائي والتي تتطلب كثافة أعلى بكثير من الرقم المذكور.



الشكل (3 - 5): جهاز التثقيب الكهربائي المعروف بالنابض الجيني Gene Pulser مع توابعه وهي باسطة (ماذقة) السعة Capacitance Extender الذي يستخدم مع الخلايا حقيقية النواة ومنظم النبضات Pulse Controller الذي يستخدم عادة مع البكتريا وبقية الخلايا بدائية النواة.

Bacteria	Field strength	Pulse Length
Agrobacterium tumefaciens	12.5 kV / cm	- 5 ms
Bacillus subtilis	16 kV / cm	- 5 ms
Lactobacillus acidophilus	6.25 kV / cm	- 5 ms
Pseudomonas Putida	6.2 kV / cm	- 5 ms
Staphylococcus aureus	6.25 kV / cm	- 5 ms
Streptococcus spp.	6.25 kV / cm	- 5 ms
Mammallan cells		
Primary bone marrow cells	625 - 750 V / cm	7 - 11 ms
Hela , cos , 3T3	500 - 750 V / m	5 - 10 ms
Fungi		
T. harzianum	2.8 kV / cm	20 ms
Dictyostelium sp.	2.5 kV / cm	0.6 ms
Plant protoplast		
Tobacco	624 - 875 V / cm	20 ms
Maize	500 V / cm	2 - 4 ms

From (Invitrogen Manual , 1992)

الجدول (3 - 1): قوة الحقل الكهربائي ومدة النبضة المستخدمة في إجراء عملية التثقيب الكهربائي لكائنات حية وخلايا مختلفة.

تمتاز عملية الاندماج الكهربائي بعدم حاجتها إلى عوامل مساعدة كيميائية كاستخدام الكلايكول متعدد الأثيلين (PEG) ، تتوفر حالياً أجهزة متعددة يمكن استخدامها في التثقيب الكهربائي والاندماج الكهربائي على حد سواء في حين يمكن استخدام بعضها في التقنية الأخيرة حسب (الشكل 3 - 6 - B, A) تستخدم تقنية الاندماج في عدد كبير من التطبيقات وتشمل:

1 - إنتاج الحيوانات عبر الوراثية Transgenic Animals.

2 - الغرس النووي Nuclear Transplants.

3 - التكاثر العذري Parthenogenesis.

4 - الإخصاب المخباري In Vitro Fertilization.

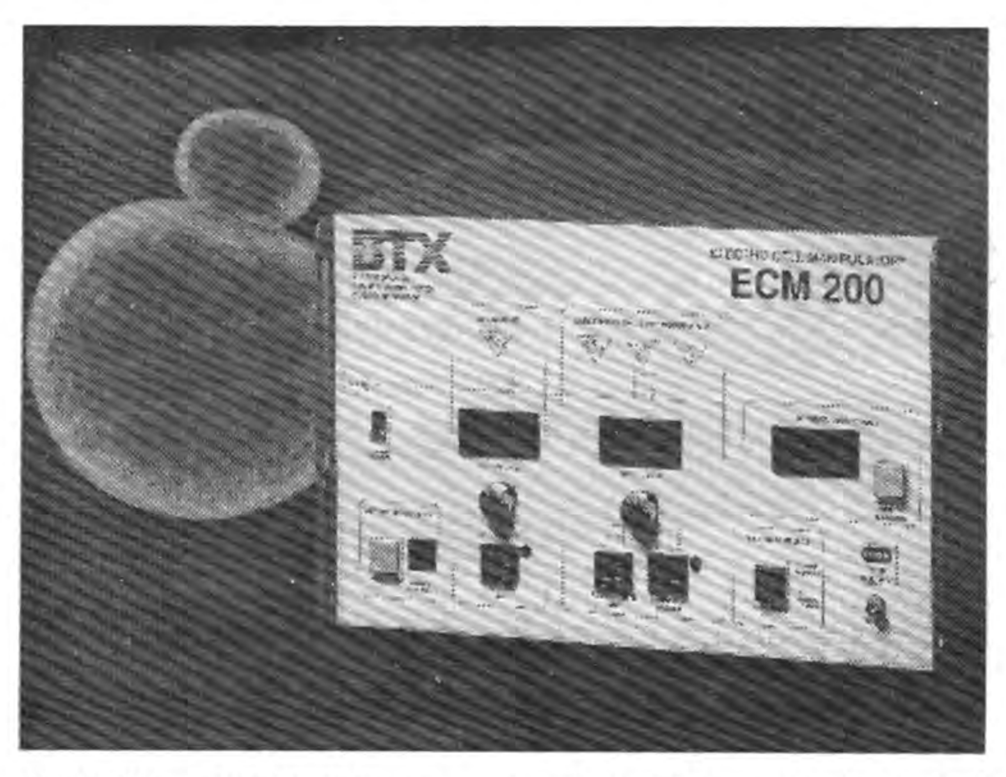
5 - إنتاج هجائن بشرية Human Hybrid.

6 - إنتاج هجائن فأرية / بشرية Human / Mouse Hybridomas.

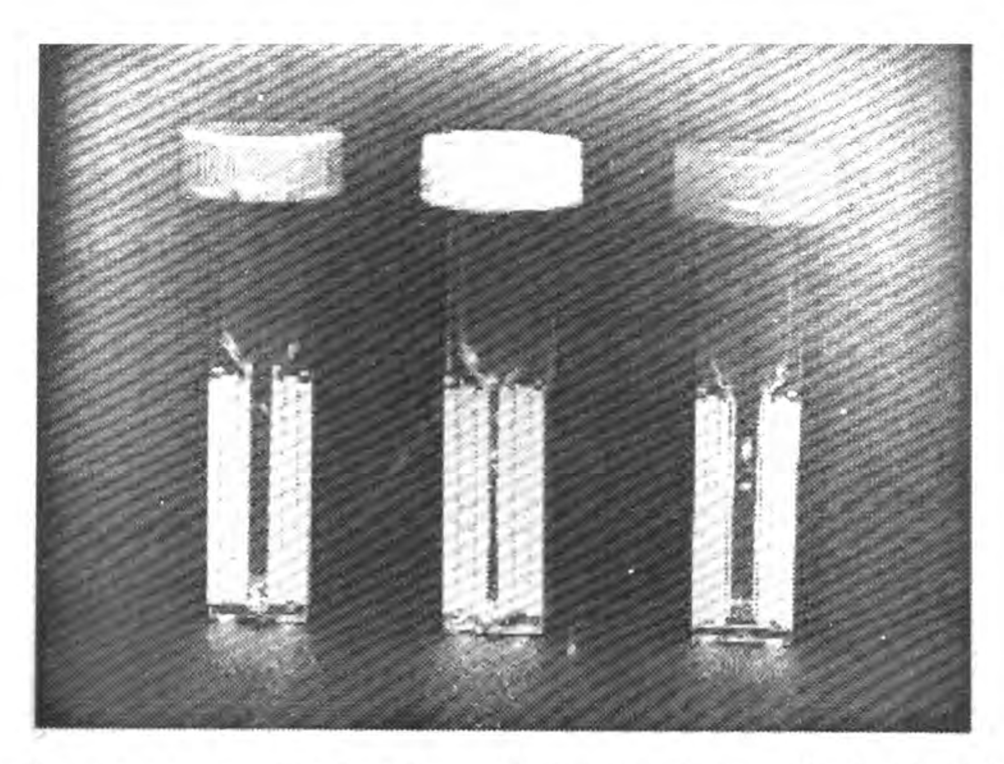
7 - بحوث إندماج الأغشية Membrane Fusion Research.

8 - إنتاج هجائن (نباتية ـ خمائر ـ فطريات ـ طحالب).

يتضح مما سبق أهمية تقنية الاندماج الكهربائي والتي استخدمت بكفاءة عالية في استنسال النعجة «دوللي» والتي سوف يتم التطرق إليها بالتفصيل في الفصل السابع.



الشكل (3 - 6 - A): جهاز الاندماج الكهربائي من إنتاج شكة (BTX) نوع ECM 200.



الشكل (3 - 6 - B): حاويات خاصة للتثقيب والاندماج الكهربائي يتم وضع عالق البكتريا أو الخلايا في ظروف تعقيمية داخل هذه الحاويات الحاوية على أقطاب كهربائية (إلكترودات) في قعر الحاويات والموجودة على مسافة محددة ومقاسة بدقة.

الفصل الرابع

هندسة التكاثر
و
آفاق التحوير الجيني

4 - هندسة التكاثر وآفاقها

4 - 1 - هندسة الجينات في خلايا واجنة الحيوانات اللبونة:

تشكل هندسة الجينات والتحوير الجيني للخلايا اللبونة مع التقنيات المتقدمة للاستنسال أحد أهم الأفكار الواعدة على صعيد التطبيق العملي لإنتاج البروتينات العلاجية وفي تحسين الذخيرة الوراثية للحيوانات الاقتصادية. على الرغم من أن الحقائق العلمية المعروفة تشير إلى أنه وباستثناء القليل من الحيوانات الواطئة مثل بعض الديدان، فإنه لا يمكن لأيّ نسيج حيواني منتزع من جسم الكائن الحي أن ينمو لتكوين كائن حي جديد وبطريقة الإخلاف أو بالطريقة التي يمكن فيها لفرع من أفرع أشجار الفاكهة أن ينمو ويكون شجرة أو شجيرات جديدة.

وقبل استنباط التقنيات المتقدمة في هندسة الجينات، كانت التقنيات التقليدية كتهجين الخلايا الجسمية أو الاندماج باستخدام الكلايكول متعدد الأثيلين Polyethylene glycol أو الاندماج المحفز بفايروس السنداي Sendai Virus هي التقنيات الوحيدة المعول عليها في نقل الجينات والتي اعتمدت أساساً على تبادل هذه الجينات من خلال اتحاد الأنوية لصفي الخلايا المندمجة أو المتحدة.

وفي العام 1976 نجح العالم جاينش (Gaenisch) ولأول مرة في إيلاج جينات غريبة (ذات مصدر وراثي مختلف) في خلايا الفأر وظهورها لاحقاً في أجيالها، حيث تمكن هذا العالم من إصابة المرحلة الجنينية (طور التويتة) في الفئران بفايروس سرطان الدم (M - MUIV) وغرس الأجنة المصابة في أمهات حاضنات Foster mothers ، وبينت النتائج أن حوالي 10 - 40 % من البالغات أصيبت بالمرض بعد عدة أشهر، كذلك أظهرت النتائج أن المرض الذي يظهر في الفئران عند نقل الفايروس يكون نتيجة لاندغام وتكامل المادة الوراثية للفايروس في خلايا الجنين كافة، ولم تقتصر على خلايا الطحال والثايموس وأن تزاوج الذكور البالغة الناتجة من الأجنة التي تكامل واتحد الفايروس في خلاياها الجرثومية الأولية التكاثرية مع إناث طبيعية أنتج جيلاً من الذكور التي نقلت الفايروس إلى 50% أفراد الجيل التالي. وتجنباً لمشاكل انتقال الفايروس إلى الرحم، تم

التركيز على دراسة الذكور فقط، حيث أظهرت الذكـور الناتجة من أجنة مصابة نقلاً متغيراً متدنياً للفياروسـات، وأظهرت التجارب حقيقة مدهشة تمثلت باحتـواء كل الخلايا الجسمية العائدة للجـيل الثاني من الذكور علـى الدنا الفايروسي وفي 50% من أفراد الجـيل انتقل هذا الدنا بصورة سائدة؛

وقد نجح هذا البـاحث الفذ في إثبات إمكانـية اندغام وتكامل الدنا الغـريبة Foreign DNA وبثبات ضـمن موروث Genome خلايا الحـيوانات اللبـونة ولأول مرة، وبذلك مـهـد هذا البـاحث لإجـراء العـديد من التـجـارب عـبـر الوراثيـة Transgenic ودراسـة التخصص الخلوي خـلال النمو الجنيني من خلال مراقبـة مصير الجينات المنقولة عـبر خلايا الخط الجرثومي Germ Cell line.

وفي عام 1960 نجح العالمان «برنسـتر ومنتز» Brinster & Mintz في إجـراء تجارب ريادية على بيـوض وأجنة الفـئران والتي تعـد مثـالية لـلاستـخدام في تجـارب التخـصص العضوي، حيث يمكن تحـفيز تكوين البيوض وإنتاج عدد من البيوض فـي مراحل مختلفة من تطورها في قناة البيض في الفئران وتنميتهـا لحين بلوغها مرحلة الخلية الأرومية Blas tocyte وعلى الرغم من سـهولة التـعامل والتطويع المجـهري لبـيوض وأجنـة الفئـران فإن التلقيح المختباري للبيوض الفأرية يكون أكثر صعوبة عنه في خلايا البويضات البشرية.

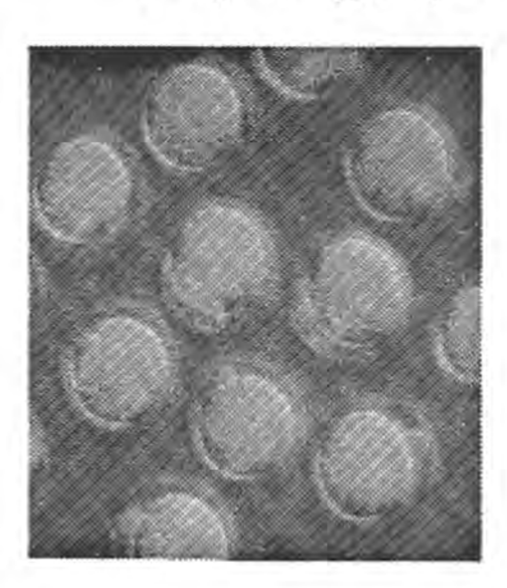
تتم عملية التطويع المجهري للبيوض المخصـبة باستخدام الماصة المجهرية، حيث يمكن إزالة ورفع هذه البيوض المخصبة وإعادتهـا مرة أخرى إلى رحـم الأمهات الحاضنات وحالما تلتصق هذه البيوض بجدار الرحم تبدأ في النمو والتطور ويمكن الحصول على نسب عالية من النجاح تبلغ بحدود 80 - 90 % من ولادات الفئران الطبيعية.

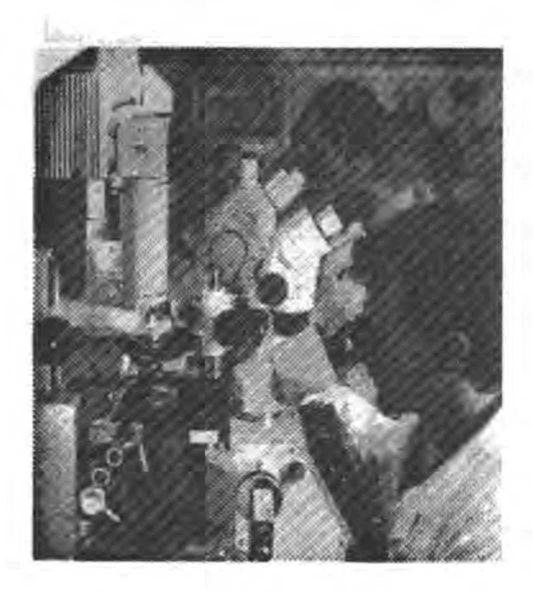
4 - 1 - 1 الحـقن المجـهـري Microinjection :

استـخدمت تقنية الحقن المجـهري (Microinjection) في إنتاج الفـئران عبـر الوراثية لأول مرة في عام 1980، ومنذ ذلك الحين فإن الآلاف من الفـئران عبر الوراثيـة «المحورة وراثيـاً» تم إنتاجـهـا واستـخدامـهـا في علم أحيـاء اللبـائن وبحوث الـسرطان والهندسـة الوراثية.

وتقنيـة الحقن المجهـري من الأساليب المـهمة في إيلاج قـطعة نقيـة من الدنا الغـريبة

ممثلة للجين المطلوب إلى داخل نواة الخلية، حيث يتمركز موروث الخلية على أمل أن تكامل القطعة المحقونة مع هذا الموروث. وتوفر هذه التقنية إمكانية حقن الدنا الجديد في الأجنة بعد الإخصاب بفترة قصيرة جداً (الشكل 4 - 1) وباستخدام إبرة مجهرية خاصة لا يزيد قطرها الخارجي عن 2 مايكروميتر وغالباً ما يتم حقن 2 بيكوليتر (1 لتر = 10^{12} بيكوليتر) من المحلول الحاوي على الدنا الغريبة في النوى الأولية ومن دون أن تحدث الضرر للجنين، وعادة ما تصنع هذه الإبر المجهرية من شعيرات زجاجية (Glass Capil laries) وباستخدام التسخين وشد مسيطر عليها (Controlled heating & tension)) يمكن إيلاج الإبرة الدقيقة داخل الجنين ومتابعة عملية الحقن بجهاز المطواع المجهري (Microma nipulator) وهو مجهر ضوئي مزود بتقنية التحكم والتطويع المجهري (الشكل 4 - 2) حيث يمكن رؤية الجنين ومحتوياته الداخلية بوضوح وتستخدم الماصة الداعمة لتثبيت وشفط الخلية الجنينية ومنع حركتها وتقييدها لمنع حصول الضرر الناجم عن إيلاج إبرة الحقن المجهري. (الشكل 4 - 3).





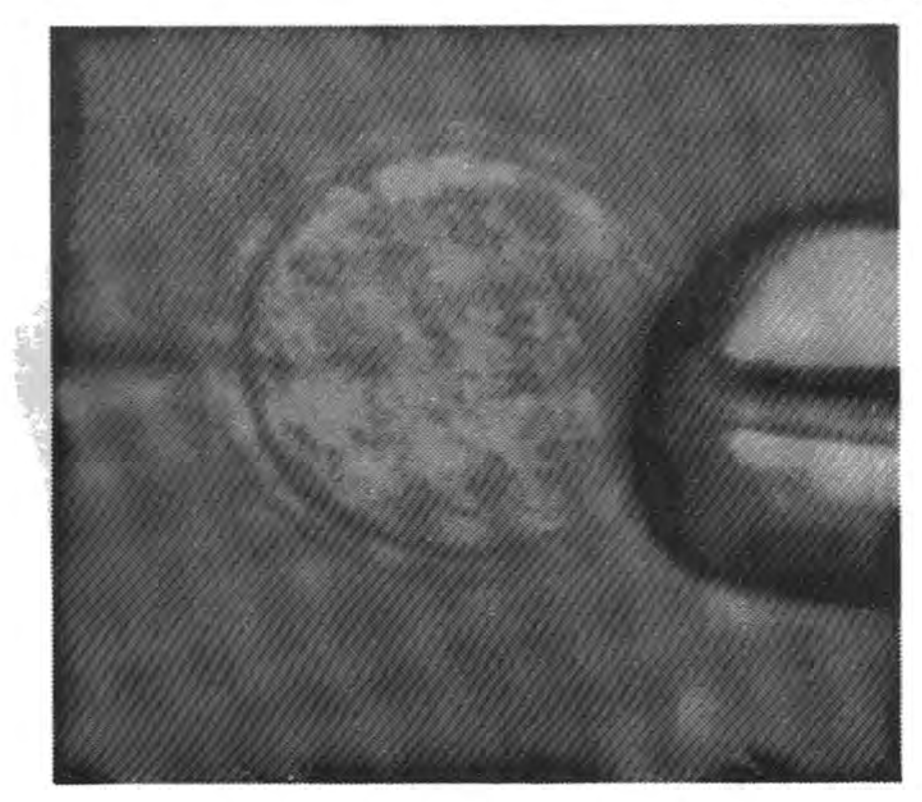
أ - الشكل (4 -1) : أجنة في أطوارها المبكرة الأولى.

ب - الشكل(4 - 2) : جهاز المطواع المجهري المؤلف من المجهر المعكوس وأداة للتحكم في الحقن المجهري للبيوض.

وتشمل الخطوات العملية لإنتاج فئران عبر وراثية، عملية هندسة الدنا الغريبة من خلال غرس الجين المطلوب تحت سيطرة الحفاز (Promoter) والجين المنظم وغرس القطعة المدمجة في ناقل استنسال (Cloning Vector) كالبلازميد ومضاعفة وتضخيم الدنا الغريب داخل البكتريا، يتم بعدها استخلاص الجينات المضخمة في النواقل وهضمها بأحد أنزيمات التقييد ذات الخصوصية النوعية وتنقيتها ومن ثم تخفيف النماذج إلى الدرجة المناسبة لإجراء عملية الحقن المجهري ولغرض الحصول على أجنة للتطويع الوراثي تعامل الإناث العذارى بالهرمونات لغرض تنظيم تواقت (Synchronization) دورتها التكاثرية ولزيادة عدد البويضات المطروحة بحيث تتحول هذه الإناث إلى إناث فائقة التبويض (Superovulation) والتي تحوي على 10 - 20 بويضة في كل مبيض وبعدد كلي 20 - 40 جنين لكل أنثى. وبعد الإخصاب بحدود 8 - 12 ساعة تصبح الأنوية الأولية ظاهرة للعيان وذات تراكيب كروية متميزة يمكن تمييزها والتعرف عليها بسهولة باستخدام المجهر الضوئي وتحت قوة تكبير تبلغ (200X - 100X) وغالباً ما تستخدم النواة الأولية الذكرية «المشتقة من الحيمن» لأغراض الحقن المجهري وذلك لكبر حجمها قياساً إلى النواة الأولية الثانوية (المشتقة من البيضة) وهذا يعود لكون نضوج الأنوية في الحيامن يحدث قبل نضوج السايتوبلازم في حين يحدث نضوج النواة في البيضة بصورة مترادفة ومتوافقة مع نضوج السايتوبلازم. وعادة ما يتم حقن ما بين 50 - 500 نسخة من شدف الدنا المهندسة وراثياً في النواة الذكرية الأولية، حيث يستدل على نجاح عملية الحقن بانتفاخ النواة الأولية المحقونة وبعد اندماج النواتين الأوليتين يتكون الزايكوت الحاوي على العدد الكامل من الكروموسومات والذي يبدأ بالانقسام لتكوين الجنين، ولا يمكن لجميع الأجنة (البيوض المخصبة) أن تنجو من الضرر الميكانيكي نتيجة غرس إبر الحقن المجهري فيها ولكن بنسباً جيدة تبلغ بحدود 60 - 80 % منها يمكنها البقاء بصورة سليمة.

وتتم جميع عمليات التطويع في ظروف تعقيمية مشددة (الشكل 4 - 4) ينمو الجنين في المختبر إلى أن يصل إلى مرحلة التويتة ويعاد زرع الأجنة المحورة وراثياً باستخدام الجراحة المجهرية (Microsurgery) في قناة البيض لإناث الفئران المستلمة ذات الحمل الزائف (Pseudopregnant) والتي يتم تهيأتها هرمونياً وبلوغها الحالة الهرمونية الملائمة

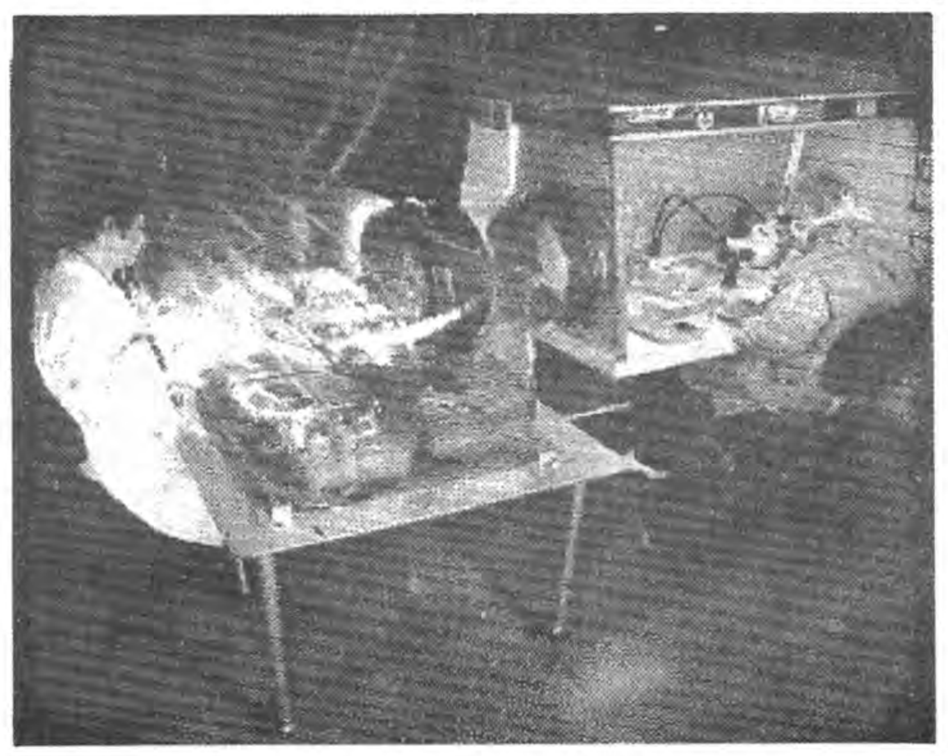
محمل وتقبل الأجنة المنقولة من خلال إجراء التزاوج بينها وبين ذكور عقيمة مقطوعة قناة الدافقة للحيامن (Vasectomized) وتسمى الإناث المستلمات للأجنة المحورة بأمهات المرضعات (Foster Mothers) ويمكن للأجنة المحقونة بعد إتمام عملية الزرع أن تحقق نمواً جنينياً طبيعياً ولحين الولادة وفي معظم الحالات يتم ترك الفئران الصغار المولودة حديثاً مع أمهاتها المرضعات حتى يصبح عمرها ثلاث أسابيع وهو العمر اللازم لفطم هذه الصغار.



الشكل (4 - 3) : تقنية الحقن المجهري للبيوض

إن الدنا المحقون إذا ما تكامل مع الموروث بثبات فإنه يتضاعف مع بقية الدنا الكروموسومي في كل دورة إنقسام خلوي وبالتالي يتوزع هذا الدنا وينتشر إلى الخلايا المنوية أثناء النمو الجنيني وعلى العكس من ذلك إذا لم يتكامل هذا الدنا مع الموروث فإنه سرعان ما يتخفف (Diluted) بسرعة أثناء التطور الجنيني ويفقد داخل خلايا الفئران

الحديثة الولادة، ولغرض التحري والكشف عن الفئرات المتحولة وراثيا يتم عزل ومسح دنا الموروث لهذه الفئران وذلك بإزالة قطعة صغيرة من ذيول الفئران الوليدة بعمر 3 - 4 أسابيع واستخلاص دنا الموروث من خلايا الذيل وتضخيم قطع الدنا الغريب المحقون والمتكاملة مع المورث باستخدام تقنية التفاعل لأنزيم بلمرة الدنا (PCR) أو التحري عن الدنا المحقون مجهرياً باستخدام طرق التهجين التقليدية (Hybridization Techniques) كتهجين وصمة سوذرن (Southern blot) .

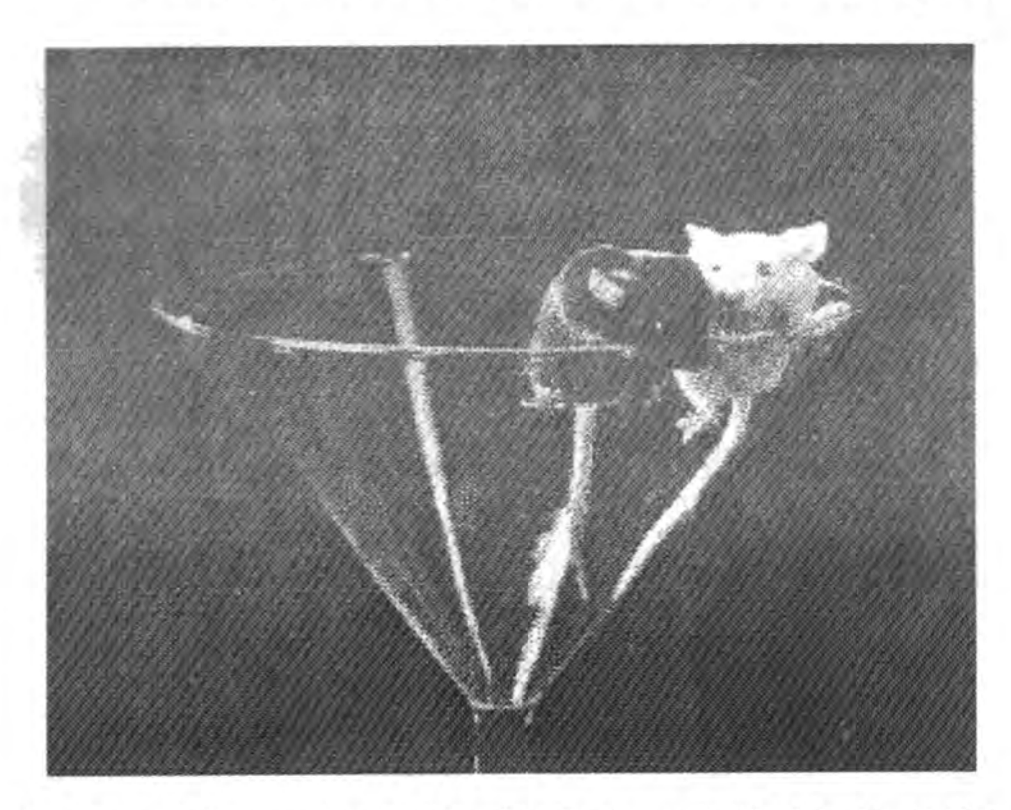


الشكل (4 - 4) : تستخدم ظروف تعقيمية مشددة في عمليات نقل الأجنة وباستخدام حاويات عزل وكابينات معقمة.

وبينت التجارب وبصورة مثيرة للدهشة أن (15 - 30 %) وفي مصادر أخرى (3 - 40 %) من الفئران الحديثة الولادة تحتوي عادة على الدنا الغريب متكاملاً ضمن موروثاتها، مما يدل على اندماج وتكامل الدنا الغريبة في أحد الكروموسومات (تحتوي خلايا الفأر على العدد الثنائي العادي للكروموسومات والبالغ 40 كروموسوما)أثناء

مراحل المبكرة من تطور الأجنة. كذلك أظهرت التجارب وجـود الدنا الغريبة المحقونة في جميع خلايا الفئـران عبر الوراثية (الشكل 4 - 5)، مما يثبت انتقالـها خلال الخط الجرثومي وفي معظم الفئران عبر الوراثيـة فإن هذا الدنا يتكامل في موضع واحد فقط على الموروث ولكن بنسخ متعددة تتراوح بين (1 - 1000 نسخة) والتي غالباً ما ترتبط في ترتيب مترادف في موقع الاندغام المفرد مع وجود اختـلاف في عدد النسخ المندمجة في الكروموسوم بين فأر وآخر.

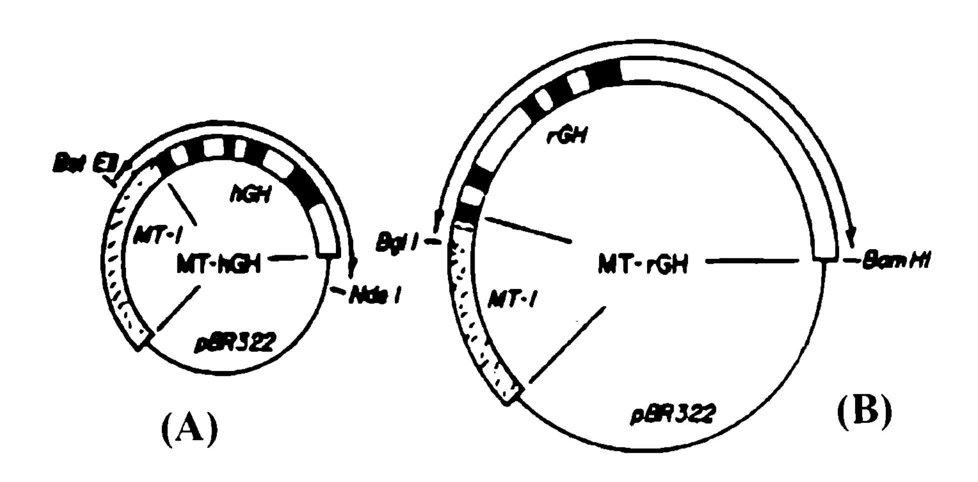
وأظهـرت التجارب أيـضاً أن السلالات الـناتجة عن تزاوج الفـئران عـبر الوراثيـة قد توارثت الدنا الغريبة حـسب القوانين المندلية وأن تعبـير الجينات المحقونة لا يكون مـتماثلاً في جميع الأفراد الناتجة، حيث اختلف مستوى تعبير هذه الجينات بين فرد وآخر.



الشكل(4 - 5): إنتاج الفئران عبـر الوراثية (المتحولة) Transgenic mice باستخـدام تقنية الحقن المجهري للبيوض.

4 - 1 - 2 الفأر العملاق Giant Mouse :

في العام 1982 أعلنت الصحف عن ولادة الفأر الجبار «مايتي ماوس» وآثار هذا الخبر ضجة كبيرة وتداعيات في الأوساط العلمية والاجتماعية، وكان الفأر العملاق تتويجاً لجهود ومحاولات العلماء لنقل صفة من أحد أنواع اللبائن إلى نوع آخر وتحقق ذلك في عام 1982 إذ استخدم ريتشارد بالمتير (Richard Palmiter) ورالف برنستير Ralph Brinster وزملاؤهما تقنيات الهندسة الوراثية في إنتاج الفأر العملاق، إذ قاموا بربط شدفة من الدنا المشفر لهرمون النمو البشري وهرمون النمو الجرذي كل على حدة إلى تعاقب (تتالي) المحضض أو الحفاز لجين الميتالوثايونين "Metallothionine - 1 "MT والذي يشفر لبروتين صغير ينتج بوفرة في أنسجة الكبد والكلية، وبعبارة أخرى فقد صنعوا جيناً خيمريا «كيمر Chimeric» جديداً عرف بجين (MT - GH) وتم ربط شدفة الدنا المدمجة لهذا الجين مع ناقل الاستنسال البلازميدي pBR 322 (الشكل 4 - 6).



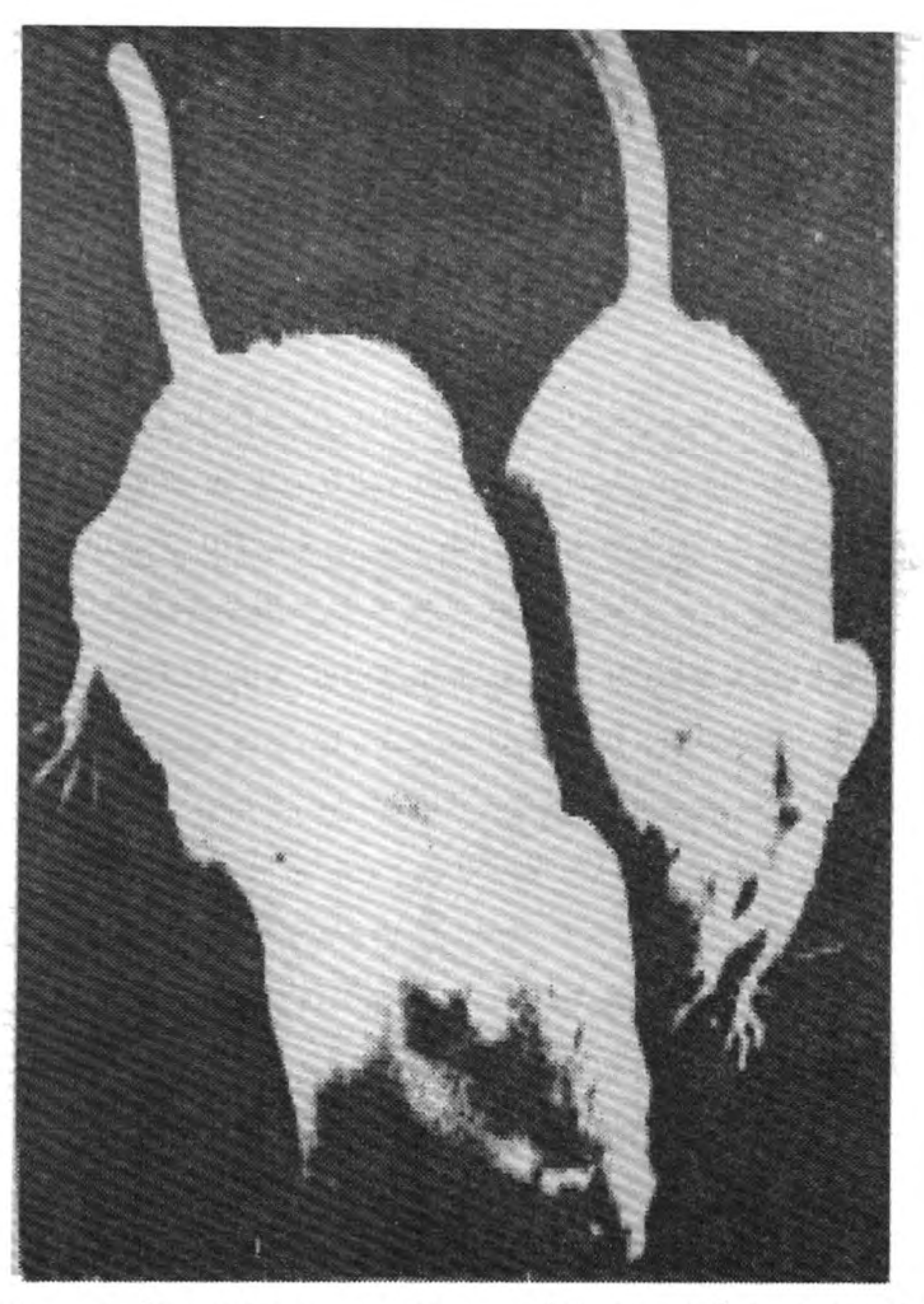
الشكل (4 - 6): ناقل الاستنسال البلازميدي المثالي pBR 322 الحاوي على حفاز جين (MT - 1) الميتالوثايونين المدمج مع جين هرمون النمو البشري (hGH) (الشكل -A-) ، جين هرمون النمو للجرذي (rGH) (الشكل - B -)، حيث تظهر الاكسونات بصورة داكنة وتتخللها الانترونات (بيضاء).

ويعبر جين هرمون النمو الداخلي المنشأ (Endogenous) في الحالة الاعتيادية في النخامى (Pituitary) ويفرز بعد ذلك إلى مجرى الدم ليقوم بأداء وظيفته في تنظيم النمو بعد الولادة (Postnatal growth)، في حين يعبر جين الميتالوثايونين عن نفسه تفاضلياً في خلايا الكبد والكلية، حيث يعمل بروتين الـ MT على حماية الخلية من المستويات السمية للمعادن الثقيلة.

وتم تصميم الجين الخيمري (MT - GH) بحيث يمكن حفاز جين (MT) كل من الرنا المرسال (m - RNA) لهرمون النمو والبروتين من التخليق من قبل خلايا الكبد، وتم حقن الجين المدمج في 170 بيضة من بيوض الفأر المخصبة حديثاً وزرعت الأجنة الناتجة في أرحام الأمهات المرضعات (6 من إناث الفئران المهيأة هرمونياً).

وبعد ثلاثة أسابيع وهي فترة الحمل الطبيعية ولد 21 فأراً صغيراً ولوحظ وجود الجين الغريب في سبعة فئران منها واتضح بعد أيام أن بعضاً من هذه الفئران قد بدأ ينمو بقدر مرتين أو ثلاث مرات أكبر من مثيلاتها الأخريات ـ وأظهرت ست من الفئران السبعة التي احتوت الجينات المولجة نمواً يتراوح بين (20 - 80 %) أكثر من البقية، أما في الفأر السابع فإن الجين الخيمري سبت ولم يعبر عن نفسه.

ولوحظ احتواء الفئران العملاقة على عدد كبير من نسخ الجين الغريب 20 - 40 نسخة لكل خلية)، وكانت أمصالها تحتوي على تراكيز عالية جداً من هرمون النمو قد تصل إلى (100 - 800 مرة) أكثر من التركيز الطبيعي للهرمون (الشكل 4 - 7) وبما أن حفاز جين (MT) غير خاضع إلى ذات آلية التنظيم بالعوامل التي تسيطر على إنتاج مستويات هرمون النمو الاعتيادية في حفازات الجينات الداخلية المنشأ فإن فرطاً في الإنتاج (Over production) سيحدث في هذه الفئران.



الشكل (4 - 7): الفأر العملاق (فأر عبر وراثي نموذجي) مقارنة مع فأر طبيعي (يؤدي التحوير الوراثي إلى إنتاج فئران عملاقة وبزيادة في وزن الجسم تصل إلى الضعف مقارنة بالفئران غير المحورة).

إن لإنتاج الفئران عبر الوراثية أهمية في الدراسات الجزيئية للسرطان والكشف عن الطفرات وكنماذج حيوانية (Animal Models) لأمراض الدم المختلفة ومنها فقر الدم المنجلي وتتيح إمكانية فهم النواحي الفسلجية المرضية وتتيح إمكانية تقييم نجاعة وفاعلية العلاج الجيني وأن هذا المجال يتطور بسرعة كبيرة في الوقت الحاضر إذ يتم الإعلان عن الحصول على أكثر من خمسة خطوط خلوية مختلفة من الفئران عبر الوراثية كل أسبوع.

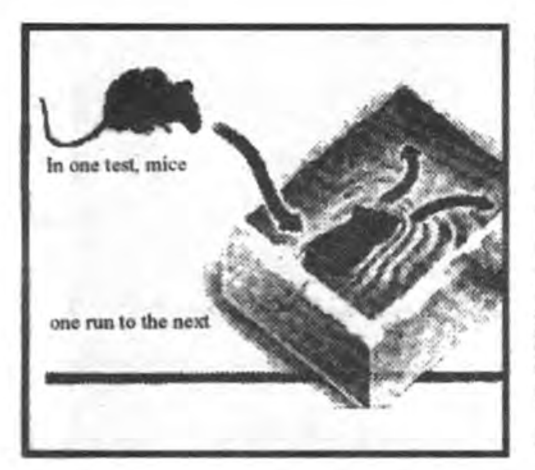
4 - 1 - 3 الهندسة التعزيزية والفئران الذكية:

يعرف مفهوم الهندسة التعزيزية أو التجميلية Enhancement Engineering بأنه تحسين نوعية الذخيرة الوراثية واكتساب صفات مرغوبة مثل لون البشرة وطول القامة ولون العيون من خلال التلاعب بالمحتوى الوراثي للبشر.

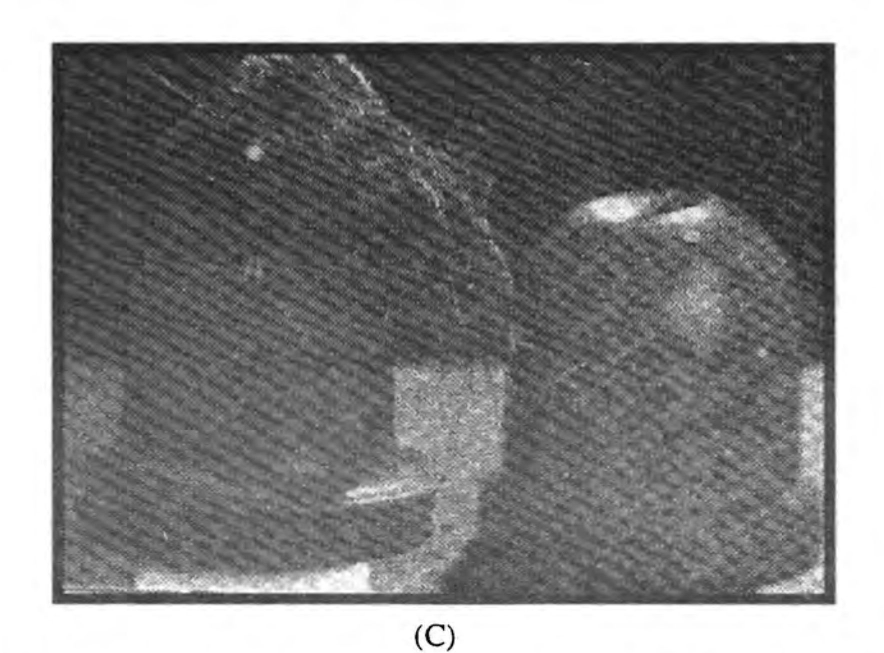
وعلى الرغم من أن التشريعات القانونية تحرم التلاعب بالجبلة الجرثومية أو خلايا الخط الجرثومي للبشر حتى لو كانت على صعيد العلاج الجيني فإن الضوابط والقوانين قد أثبتت دوماً عدم حصانتها تجاه العبث والاختراق ممن لا يؤمنون بالنواحي الأخلاقية والتزاماتها في العلوم المختلفة، حيث يمكن لهؤلاء الاستفادة مما يتوصل إليه الباحثون الآخرون في مجال الجينات البشرية وخصوصاً جينات السلوك ومنها الذكاء في تعزيز تلك الأفكار المتطرفة المتعلقة بتكوين شعوب بالغة الذكاء أو شعوباً في منتهى الغباء.

ففي شهر نيسان 2000 نشر الباحث «جوي تسين» Joe Z. Tsien (الشكل 4 - 8 - A) نتائج أبحاثه المتعلقة بإنتاج الفئران الذكية أو الماكرة والفئران الغبية أو المغفلة والاختبارات التي أجراها على هذه الفئران والتي شملت قدرة الفأر علىء التوصل إلى المنفذ الصحيح في متاهة الماء وقدرته على التعرف على الأشكال الهندسية المختلفة (الشكل 4 - 8 "B" , "C").

ويشكل إنتاج الفئران الذكية باستخدام تقنيات الهندسة الجينية الخطوة الأولى المهمة نحو استنساخ الذاكرة والمهارة والخبرة، وفي تحسين ذاكرة الإنسان، وإنتاج عقاقير منشطة للذاكرة عند كبار السن ومساعدة المصابين بالاختلالات العقلية والجنون وفي إمكانية زيادة الجرعة الجينية لجينات الذكاء (IQ) والنواحي الأخرى ذات العلاقة بالهندسة التعزيزية.



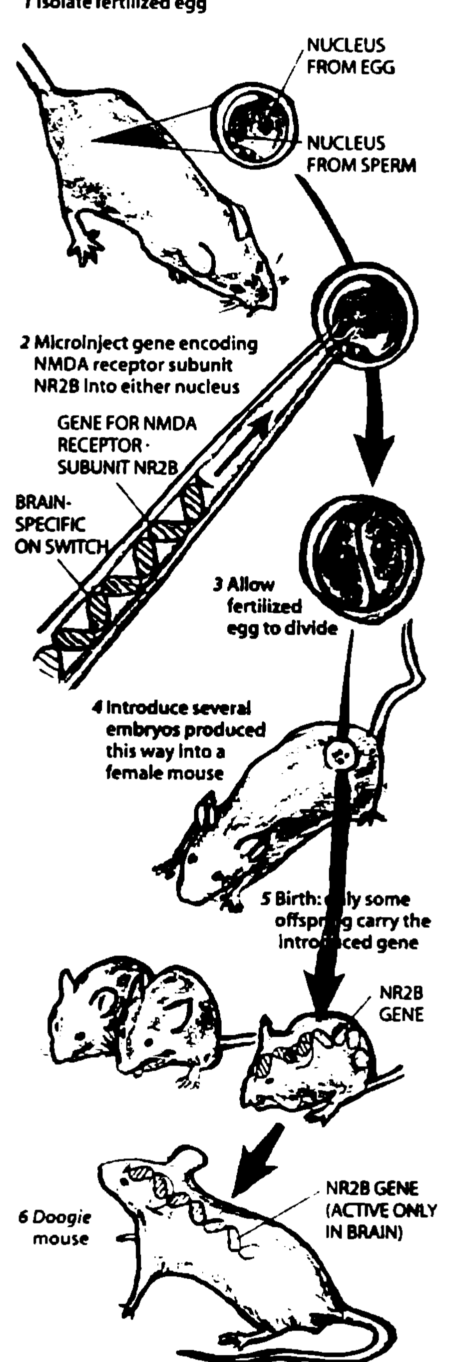




(C)

الشكل (4-8) ب : الشكل (C) باستخدام أشـكال مختلفة من قطع هندسية مـختلفة يمكن للفأر الذكي التمييز بينها.

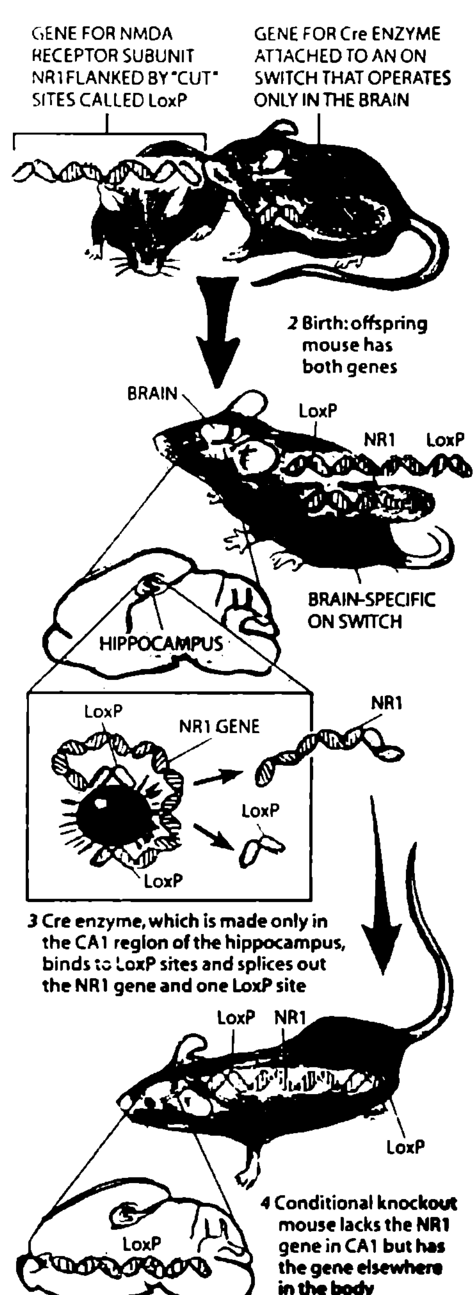
وتمكن البــاحث «تسين» من إنتــاج الفـأر
ذكي أو الماكـر بـاسـتـخـدام تقنيــات الهندسـة وراثيــة (الـشكل 4 - 9) وذلك بعـــزل الجين سؤول عن إنتـاج بروتين خاص يعـرف بمستلم غدا NMDA والذي يـتكـون من وحــــدتـين ثانويـتين، الأولى تعــرف NR1B والأخــرى NR2B، تتــضـــمن الخطوة الأولـى لتـقـنـيــة الاستنسال عـزل البـيوض المخـصـبة من الفـأرة وعادة تكون هذه البيوض المخـصبة، وحاوية في المراحل المبـكرة لحـدوث الإخـصـاب عـلى أنوية أولية مميزة إحداها ذكـرية (من الحيمن) والأخرى أنثـوية (من خليـة البـيضـة)، حـيث يتم الحـقن المجـهري لـلجين المشـفر والمسـؤول عن الوحـدة الثـانوية NR2B للمـسـتلم البـروتيني NMDA في إحـدى هاتـين النواتين الأوليـتين (ويـفـضل النواة الذكـرية)، تنقسم البـيضـة المخصـبة لعـدة مرات ثم يتم غرسهـا في رحم فأرة تعرف بالأم المرضـعـة والتي تتم دورة الحـمل إلى نهايـتهـا. ويتم الحصول على ذرية من الفئران التي يحتوي بعضـهـا على الجين الغريب المحقـون والذي يمتاز بميـزة مهـمة هو قـدرته على التـعـبـير في خـلايا الدمـاغ حصـراً حيث يعـمل البـروتين على زيادة قـوة الاتصـال بـين العـصـبـونات والـتي تشكل الأساس للتعلم والذاكرة.



الشكل (4 - 9): إنتاج الفأر الذكـي (الماكـر) باسـتـخـدام تـقـنيـات الحـقـن المجـهـري للبيـوض المخصبة للفأر ←

إن قدرة الإنسان على التعديل والتحوير الوراثي باستخدام التقنية الموصوفة وتطبيقها على الإنسان ممكنة من الناحية النظرية كما يرى العلماء ولكن مع الأخذ بنظر الاعتبار درجة التعقيد الكبيرة للذاكرة البشرية.

هذا ونجح الباحث في إنتاج فئران في غاية الغباء أسماها الفئران الغبية أو المغفلة، وباستخدام تقنية مختلفة (الشكل 4 - 10) وذلك بتنمية فأرين أحدهما يكون حاوياً على جين المستلم NMDA للوحدة الثانوية NR1 المعلقة بين مواضع قطع تعرف بـ (LoxP) والفأر الآخر يكون حاوياً على جين يعرف بـ (Cre) والذي يشفر لأنزيم معروف ويرتبط هذا الجين بتتابع منظم لذا يكون تعبيره مقصوراً على الدماغ دون الأعضاء والأنسجة الأخرى، وفي مرحلة لاحقة تكون الذرية الناتجة من هذه الآباء حاوية على كلا الجينين في موروثها، حيث يرتبط الأنزيم Cre والذي يخلق فقط في منطقة CA1 من الحُصَيْن hippocampus مع مواضع LoxP، وبذلك يتم الحصول على فأر يحوي جين NR1 المحاط بمواضع LoxP في كل خلايا الجسم باستثناء منطقة الـ CA1، أو بمعنى آخر يتم الحصول على طفرة استهدافية شرطية تمثل الفأر الغبي وهو ما أكدته اختبارات لاحقة ومنها متاهة الماء.



الشكل (4 - 10) : إنتاج الفأر الغبي (المغفل)

←

4 - 1 - 4 التحوير الجيني لإنتاج البروتينات العلاجية :

حقق الجمع بين تقنيات الاستنسال البايولوجي وتقنيات التحوير الوراثي انجازات واعدة على صعيد الحصول على كميات غير محددة من البروتينات البشرية العلاجية النادرة بنقاوة عالية وكلفة معقولة وفي بدء حقبة جديدة من عصر التقنيات المتقدمة التي تعتمد على النباتات والحيوانات عبر الوراثية لإنتاج هذه البروتينات العلاجية بدلاً من المخمرات الحيوية التقليدية بأوعيتها الفولاذية الضخمة ومعدات التحكم المعقدةوالأوساط الزرعية التخميرية المكلفة مع ضرورة التعامل الحذر مع اللقاحات الحيوية ومشاكل التلوث وتردي الإنتاجية وعمليات التنقية. إذ وفرت التقنيات الأحيائية بديلاً أكثر سهولة وأماناً وأقل كلفة.

إن إمكانية إنتاج مكونات الدم البشري في المزارع الحيوانية الحية كإنتاج بلازما الدم والأجسام المضادة في البلازما وبروتينات الدم الأخرى، يمكن أن توفر مصدراً ثابتاً لمنتجات الدم الرخيصة والآمنة تبلغ قيمتها بحدود 2.5 مليار جنيه استرليني من مجمل سوق منتجات الدم في العالم الذي يناهز 7 مليارات جنيه في العام الواحد، وكسائر الأدوية الجديدة ما زالت البروتينات البشرية المنتجة بالتحوير الجيني تحتاج إلى اختبار دقيق لمعرفة فعاليتها وسلامتها قبل السماح باستخدامها.

ونتيجة لمشاريع بحثية مضنية، ولدت في العام 1996، أنثى الخنزير التي أطلق عليها اسم «جيني» وهي أنثى خنزير محوّرة جينياً والتي يحتوي حليبها على البروتين البشري (C) والذي يحتاج إليه المصابين بنوع من العوز الخلقي لدعم المخزون الضئيل من البروتين في أجسامهم، ويساعد هذا البروتين في التحكم بعملية التخثر، ويلعب دوراً مهماً في علاج المرضى الخاضعين لجراحة استبدال المفاصل.

اعتمدت تقنية التحوير الجيني على دمج شدفة (قطعة) من الدنا الممثلة للجين البشري المشفر للبروتين البشري (C) مع تعاقب (تتالي) لدنا الحفاز (المثير أو المحضَض) (Promoter) لبروتين رئيسي في حليب الفئران هو بروتين المصل الحمضي Whey Acidic Protein وذلك لغرض ضمان التعبير الموقعي للجين في النسج الثديية للخنزير حصراً وقد تم حقن شدفة الدنا المدمجة في مجموعة من أجنة الخنازير، وزرعت هذه الأجنة في أمهات بديلة من الخنازير وبعد أربعة أشهر وُلدتْ أنثى الخنزير الصغيرة «جيني» التي احتوت على الجين المشفر للبروتين (C) في خلاياها، وتحتم الانتظار لمدة سنة أخرى حتى بلوغها سن النضوج، حيث وجد أن الحليب المفرز احتوى على كمية من البروتين

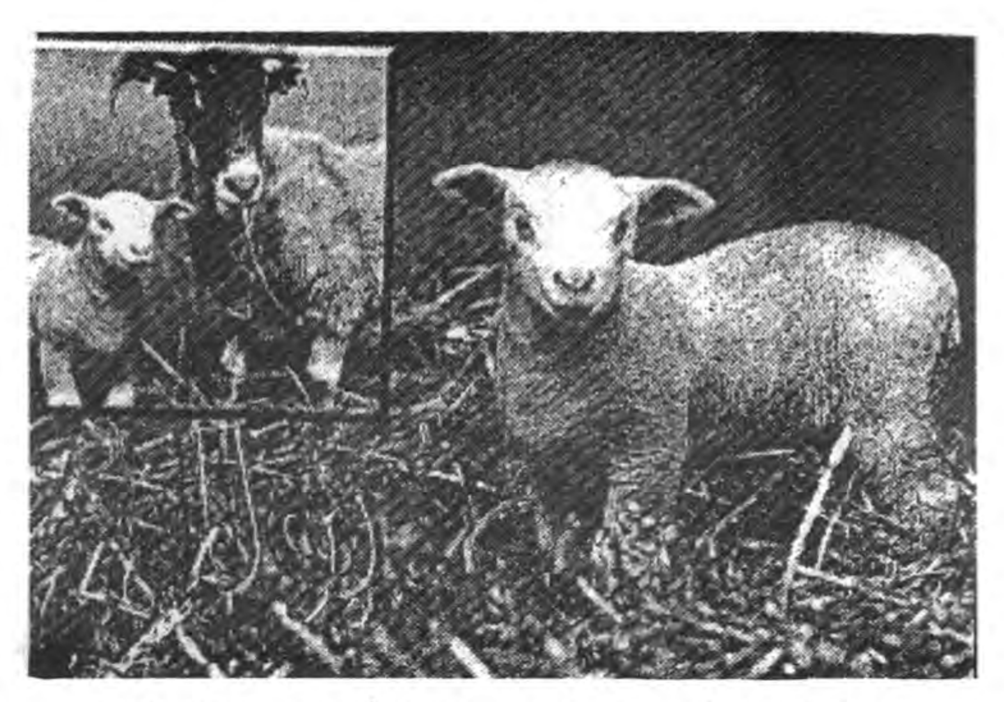
(C) بحدود غرام واحد في كل ليتر من الحليب، وهذا يعادل 200 ضعف تركيز هذا البروتين في بلازما دم الإنسان.

وأجريت دراسات مستفيظة تتعلق ببروتينات الدم الأخرى، ومنها بروتين منشط نسيج البلازمينوجين «مولد البلازمين» (Tissue Plasminogen Activator) ويعرف اختصاراً (tpA)، حيث تم استنسال الجين المشفر للبروتين في ماعز محوّرة جينياً، وتضمنت تقنية التحوير الوراثي دمج الجين المشفر للـ (tpA) مع الجينات المنظمة التي تسيطر على عملية تعبير هذا الجين وإفراز البروتين مع الحليب ومن ثم حقن الجين ذو التركيب الوراثي الجديد في الأنوية الأولية للبيوض المخصبة للماعز.

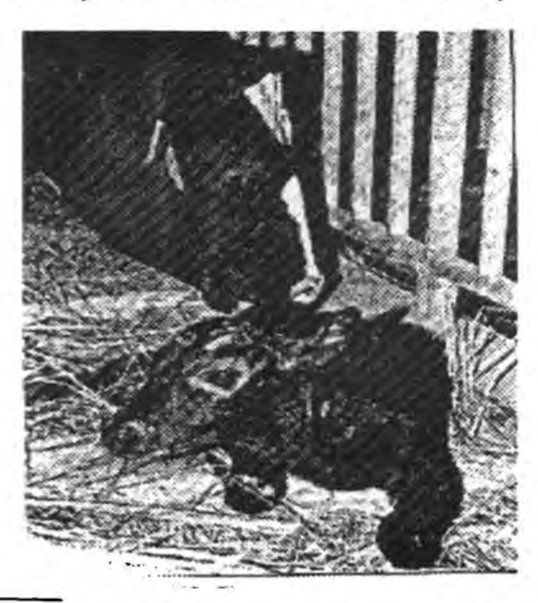
وتمكن الباحثون في معهد «روزالين» في اسكتلندا من إنتاج أبقار ونعاج محوّرة وراثياً تستطيع تصنيع بلازما الدم وبكميات بحدود 10 آلاف مرة أكثر مما يقدمه المتبرعون من البشر سنوياً، وبعد استنساخ الحمل «دوللي» أعلن الباحثون في معهد روزالين وشركة (بي. بي. الـ. ثيرابيوتكس) «P.P.L. Theraputics» عن استنساخ الحمل «بوللي» التي تحمل جينات بشرية (الشكل 4 - 11) وهي واحدة من خمسة نعاج ولدن لأمهات مختلفات وبطريقة الجمع بين التحوير الجيني والاستنساخ البايولوجي.

4 - 1 - 3 تقنية الخلايا الجذعية والاستنسال البايولوجي:

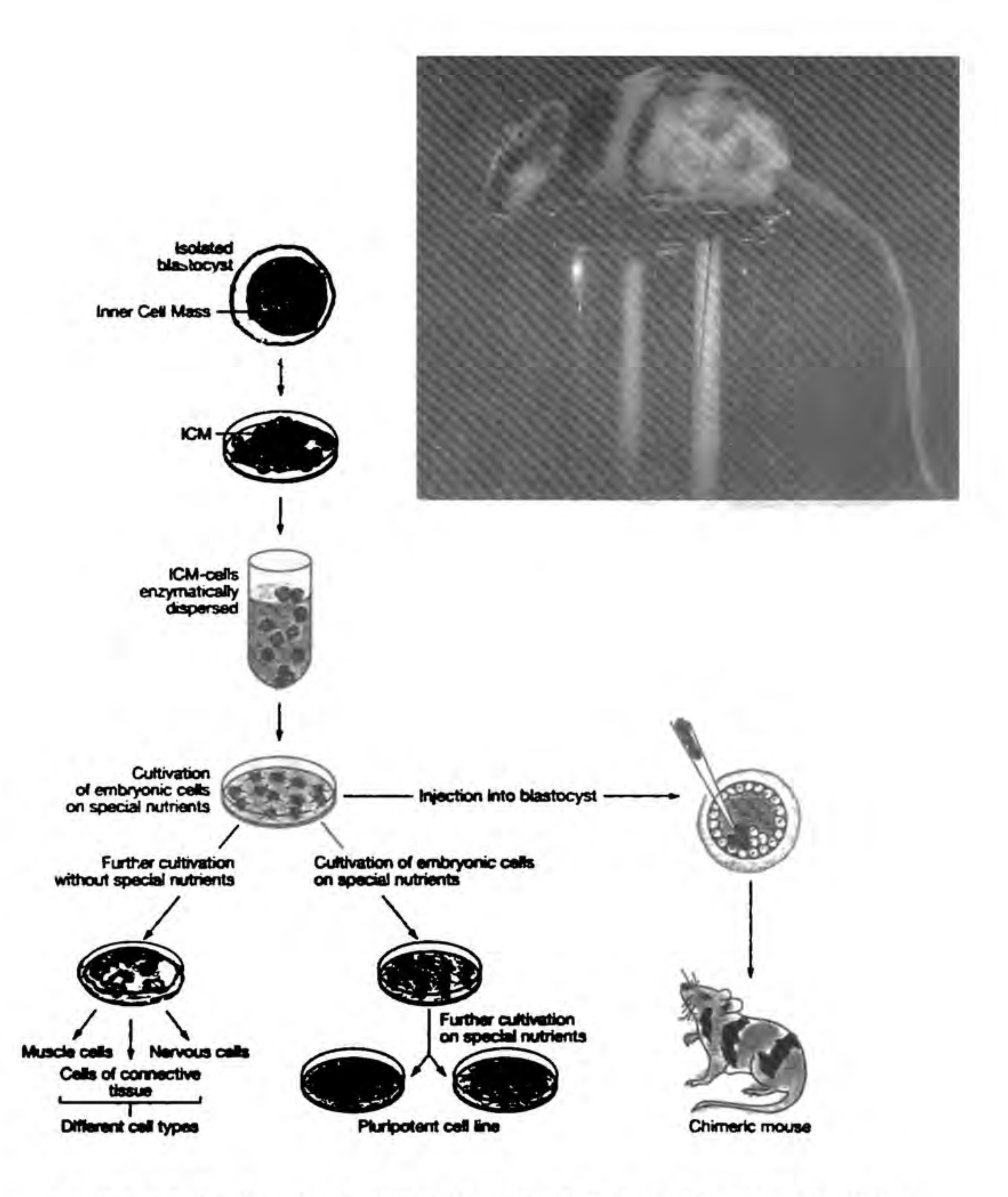
تشكل تقنية الخلايا الجذعية الجنينية أحد أهم التقنيات المتقدمة التي يمكن أن ترافق وتتكامل مع تقنية الاستنسال البايولوجي في تطبيقات واعدة، حيث يمكن إنتاج خطوط خلوية من الخلايا الجذعية وافرة الجهد أو كامنة الفعالية Pluripotent Stem cells (الشكل 4 - 12) وذلك بتنمية الكيسة الأريمية في طبق بتري وبعد بضعة أيام تتطور كتلة الخلايا الداخلية (ICM)، حيث يتم فصل الكتلة الخلوية وتشتيتها أنزيمياً وإعادة استنباتها في أوساط جديدة وعلى طبقة مغذية Feeding Layer من الفايبروبلاست، إذ تتطور مجاميع من الخلايا التي يمكن حقنها في كيسة أريمية من حيوان آخر، وحدوث الاندغام في الكتلة الخلوية الداخلية منتجة فأرا متعدد المصادر الوراثية «هجين» كايميرا (الصورة في الأعلى)، وفي حالة إعادة استنبات الكتلة الخلوية بدون طبقة مغذية مناسبة فإنها تتمايز مباشرة إلى الأنماط المختلفة من الخلايا، أما ذا ما تمت عملية الاستنبات وتنمية الخلايا الجنينية على مغذيات خاصة وتكرار العملية يؤدي إلى الحصول على خطوط خلوية من الخلايا الجذعية كامنة القدرة أو الفعالية، حيث يكون لهذه الخلايا العديد من التطبيقات المهمة (الشكل 4 - 13).



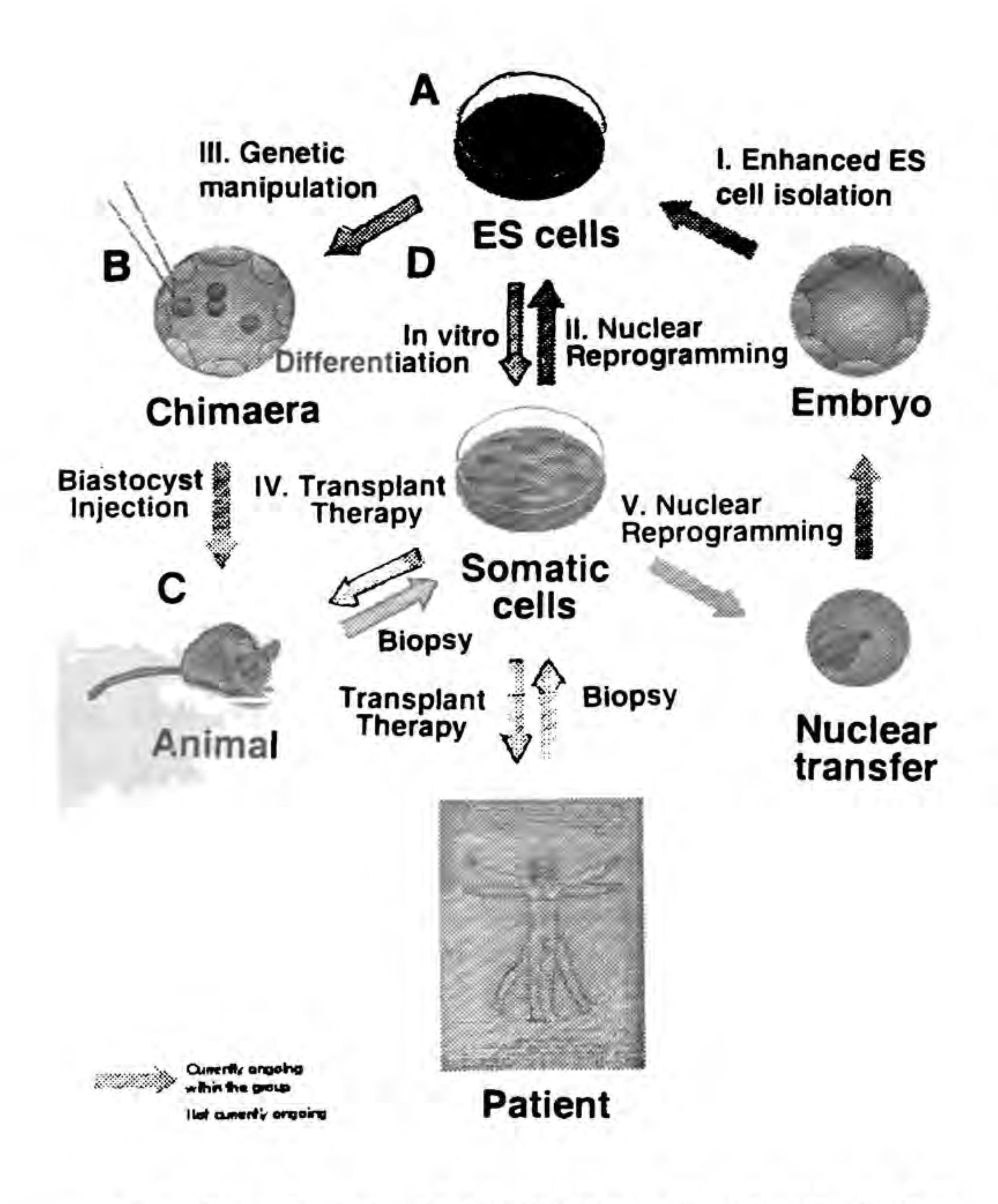
النعجة «بوللي» التي تحمل جينات بشرية.. و «بوللي» وأمها في الصورة داخل الإطار



الشكل (4 - 11): شمل التحوير الجيني حيوانات اقتصادية مختلفة كالنعاج والأبقار. في الأعلى النعجة «بوللي» الحاملة للجينات البشرية أنتجها معهد "روزالين" والصورة في الأسفل للعجل «جين» الذي تم استنساله في "ديفورست"



الشكل (4 - 12): إنتاج خطوط خلوية من الخلايا الجذعية وافرة الجهد أو كامنة الفعالية.



الشكل (4 - 13): التطبيقات المختلفة للخلايا الجذعية الجنينية ومنها العلاج بغرس الأنسجة والأعضاء والطرق المختلفة للحصول على الخلايا الجذعية الجنينية

4 - 1 - 4 العناصر المنظمة النوعية للأنسجة :

Tissue - Specific regulatory elements

إن القـدرة على بناء جينـات كايمرية «خـيمـرية» (Chimeric genes) ومن ثم إدخال هذه الجينات إلى موروث الفأر بالحقن المجهري قـد سمحت للعلماء بإجراء البحوث داخل الحي (in vivo) ودراسة التعاقبات المنظمة لتعبير الجينات في الحيوانات اللبونة.

وتوجهت هذه البحـوث نحو تحليل العناصر المنظمـة للجينات التي يتم التعبـير عنها بمستويات عالية في أنواع معينة من الخلايا في حيوان توضح تنظيم تعبير الجينات التي تعبر في خلايا متعددة مختلفة يكون أكثر صعوبة.

وهناك افـتراضان أسـاسيـان حرجـان بالنسبـة لإمكانيـة استخـدام الفئـران المهندسة وراثـياً لتشخيص ودراسة العناصر المنظمة:

الافتراض الأول: هو أن التنظيم يتحقق من خلال تعاقبات نوعية من الدنا الذي يقع ضمن أو بالقرب من المنطقة المستنسخ.

أما الافتـراض الثاني، فهو أن هذه التعـاقبات يمكن أن ترتبط بتعـاقبات مشفـرة غير ذات علاقة (unrelated coding sequences) يمكن غرسها في مواقع جديدة في الموروث مع احتـفاظها بخـواصها التنظيـمية، وبعـبارة أخرى فـإن تنظيم الجينات يفتـرض أن يعود وظيفـياً إلى تعـاقب من الحامض النووي يقـابل المواقع الكروموسـومية، والبـروتين المنظم الوثيق الصلة من المفـروض أن يكون قـابل للانتـشار ومـوجود بوفـرة حـتى يمكنها إيجـاد العوامل المنظمة المشابهة (cognate) حتى في المواقع الجديدة novel على الموروث.

ومن الاسـتراتيـجيـات الفعـالة لدراسة العـوامل المنظمة هو من خـلال عمل جـينات كايمرية التي تحوي على العناصر المنظمة المفترضـة من أحد الجينات المرتبطة بالتعاقب المشفر لأحد الجينات المخبرة (Reporter gene) غير ذات الصلة.

وغالباً ما تستخدم جينـات البكتريا كجـينات مُخبـرة وذلك لسهـولة التعرف عليـها وتشخيصها في الفئران عبر الوراثية إضـافة إلى الافتـراض بكونها لا تحـوي أية عناصر

منظمة يمكنها العمل في الحيوانات اللبونة. وفي جينات حقيقية النواة وأيضاً بدائية النواة فإن منطقة الموروث الواقعة أعلى المجرى (up stream) أي الواقعة إلى الأعلى من نقطة أو موقع بدأ الاستنساخ هي منطقة الحفاز (Promoter) والتي تحتوي على التعاقب النيوكليوتيدي الذي يحث ويحفز تعرف أنزيم بلمرة الرنا (RNA polymerase) وارتباطه بشريط الدنا وبدء عملية الاستنساخ، حيث أن كل جين يمتلك منطقة حفاز فكيف يتم تأسيس الخصوصية النسيجية ؟ وهل التعاقب الذي يؤكد تعبير جين النسيج المتخصص يتموضع قرب الحفاز أو في منطقة بعيدة عنه.

وأظهرت البحوث حول الفئران عبر الوراثية (transgenic mice) بأن العديد من الجينات تملك عواملاً منظمة نوعية أو متخصصة للنسيج تكون ذا موقع أقرب إلى الحفاز ضمن الأزواج القاعدية الـ 1000 - 2000 الأولى الواقعة في أعلى المجرى من موقع بداية أو بدء الاستنساخ وكنموذج أو مثال متخصص أو نوعي هو الألفا - أ - كرستالين - α A - crystallin والذي يعبر بصورة نوعية في خلايا عدسة العين Lens cell of the eye)) والبروتين يعمل على تزويد العدسة بشفافية فريدة (unique transparency) والتي هي العامل الحاسم في وظيفة الجهاز البصري.

وتم استنسال جين الألفا - A - كرستالين وقطعة من الدنا تحوي على 450 زوج قاعدي متاخمة لموقع بدء الاستنساخ تم ربطها إلى التعاقبات المشفرة من جين المخبر البكتري الأصل والفأر المبرمج تم توليده بالحقن المجهري للجين الكايميري وتم اختبار الفأر من حيث أنماط التعبير للبروتين البكتيري والأنزيم البكتيري تم تحديده على وجه الحصر في العيون للفئران عبر الوراثية.

وتعبير الجين العابر (المتحول وراثياً) transgene لم تستهدف النسيج الصحيح حسب بل بدأت بذات المرحلة الجنينية لتطور العدسة كما هو الحال في مورث α - A - crystallin الداخلي المنشأ (الأصيل).

وأوضحت هذه الدراسات بأنه حتى الأشرطة القصيرة من الدنا يمكن أن تحوي تعاقبات منظمة والتي تكون كافية لتزويد نوعية النسيج وتنظيم الجينات النوعية للمرحلة

حتى عندما تتصل مع تعاقبات مشفرة غير ذات صلة وعندما تدغم أو بتكامل مع مواقع جديدة في الموروث.

وأجريت دراسات أخرى على العديد من جينات النوعية النسيجية لحقيقة النواة تتراوح بين الايلاستيز (Elastase) إلى الأنسولين (Insulin) إلى البروتامين Protaminc وإلى الرودوبسن Rhodopsin وإلى اميونوكلوبيولينات imunoglobulins التي أعطت نتائج مشابهة ويمكن للتعاقبات الواقعة قرب موقع بدأ الاستنساخ وغالباً بحدود 150 - 100 زوج قاعدي أن تحدد بدقة التنظيم النوعي للنسيج الموجه لتعبير الجين في الفئران عبر الوراثية، ولكن هذه العوامل المنظمة غالباً ما تكون غير كافية لإنتاج المستويات العالية من التعبير والتي تعد صفة من صفات الجينات الداخلية المنشأ. لذا فإن العوامل المنظمة الإضافية التي يمكن أن تتواجد قد تحفز فعالية تعاقبات الحفاز الأقرب أو الأدنى (Pro moter Proximal Sequenas) وتؤدي إلى زيادة وتحفيز التعبير.

ومن الأمثلة الموصوفة جيداً للعوامل المنظمة التي تحفز فعالية منطقة الحفاز حتى تلك التي تتموضع بعيداً هو جين الهيموكلوبين hemoglobin gene والهيموكلوبين.

هو تترامير (tetrramer) يتكون من تحت وحدات اثنان نوع ألفا α واثنان نوع β كلوبين globins subunits والألفا والبيتاكلوبين تعبر بصورة نوعية في خلايا الدم الحمراء وبصورة مثيرة للاهتمام فإن هناك نوعان منهما، جنيني وبالغ والكلوبينات الجنينية تسمح لكريات الدم الحمراء الجنينية باقتناص الأوكسجين من النوع الناضج أو البالغ للهيموكلوبين في الدورة الأمية (Maternal circula-tion)) وضمن الموروث لمعظم الأحياء حقيقية النواة الراقية وبضمنها الإنسان والفأر فإن جين الألفا والبيتاكلوبين تكون ضمن عناقيد Clustersوفي مناطق مختلفة من الموروث.

ويتاح خلال التطور الطبيعي نمط متواقت Sequential Pattern من التعبير ضمن كل عنقود جيني وبذلك يتم التعبير عن الوحدات الثانوية Subunits الجنينية أولا والتي يتم استبدالها لاحقاً بتعبير عالي المستوى في الأشكال الناضجة (adult form).

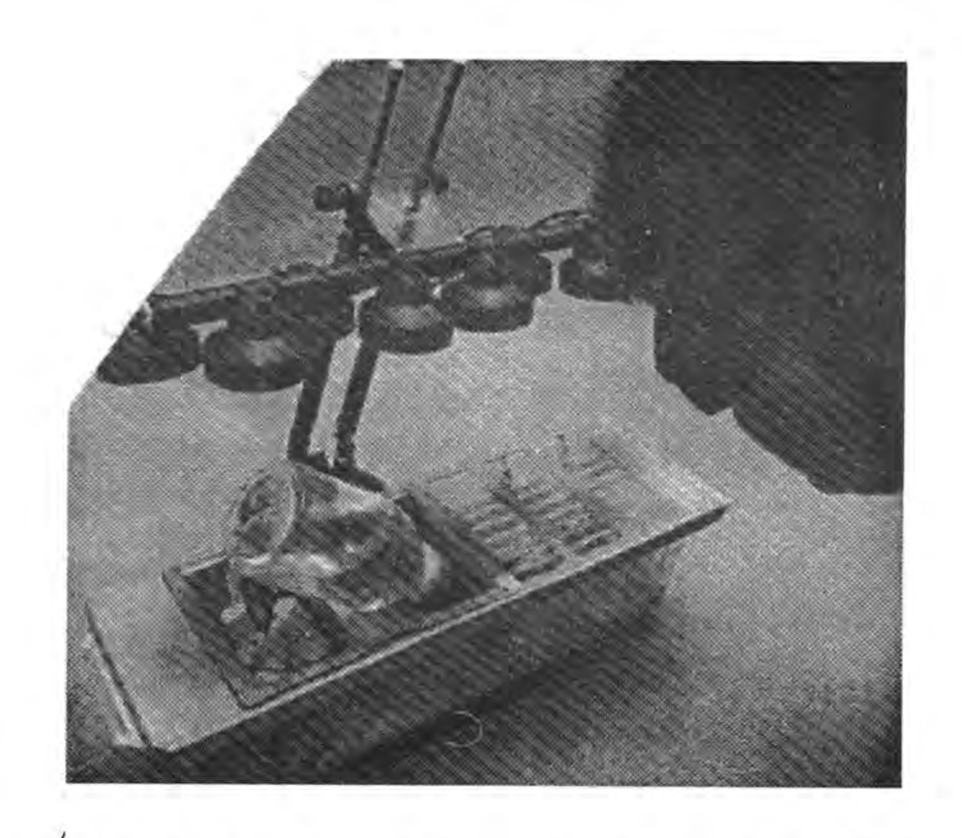
فما هي أهمية وجود الجينات في عناقيد (تعنقد الجينات) وضرورته لأنماط التعبير

جيني أو أنها ببساطة تعكس حقيقة أن الجينات في كل عنقود مرتبطة تطورياً أو افتراضياً ي تشتق الواحدة من الأخرى؟

وتمكن العلماء باستخدام الفئران عبر الوراثية من دراسة تنظيم جين الكلوبين (glo bin) والتجارب الأولية بينت بأن مناطق تعاقبات الحفاز الأقرب المجينية يمكنها أن توفرتعبيراً نوعياً للأنسجة tissue - specific ونوعياً للمرحلة Stage - specific للكلوبين الجنيني والناضج وعموماً فإن الجينات العابرة (Transgenes). كانت بالكاد ذات تعبير محسوس أو لم تعبر إطلاقاً.

وهذه النتائج دعت العلماء إلى الشك بوجود مناطق تنظيمية إضافية مهمة. وقد تبين أن التعاقبات المجينية (الموروثية) المحيطة بعنقود الجينات الكلية للبيتا - كلوبين تكون حساسة بصورة فريدة للهضم بأنزيم الدناز DNase I 1 في الخلايا الدموية الحمراء تحديداً وليس في أي نمط آخر من الخلايا، وهذه الحساسية الفائقة للقطع بأنزيم DNaseI تشير إلى أن التعاقبات المجينية في هذه المناطق هي ذات شكل مفتوح (0pen) وبالشكل الذي يجعلها متاحة ومهيأة للتداخل مع البروتينات المنظمة الإيجابية (Positive Regulatory Proteins) وحين تم استنسال المناطق ذات الحساسية الفائقة للقطع بالأنزيم وربطت مع تتابعات الحفازات للكلوبين أصبحت هذه الحفازات ذات فعالية كاملة في الفئران عبر الوراثية وسميت عناقيد المواقع الفائقة الحساسية لأنزيم الدناز I بالمناطق المنشطة لمواقع الكلوبين globin Locus Activating Region (LAR) وتكون مواقع الـ (LAR) فعالة حتى عندما تكون على بعد أكثر من 10.000 زوج قاعدي من متلازماتها وحفازها مما يعني وجود نوعاً من الاتصال ضمن الموروث.

وتتوفر الآن وعلى نطاق تجاري الكثير من العدد التشخيصية للتعبير الجيني (الشكل 4 - 15) مثل العدة المجهرية GFP - MD56 والتي تكشف عن الفئران عبر الوراثية التي استنسل فيها الجين المرغوب ونجح في التعبير باستخدام ضوء متفلور خاص، حيث عند تسليط ضوء فلورسنت خاص تظهر الفئران الحاوية على الجين المستنسل مضيئة.



الشكل (4 - 15) : عدة الكشف عن التعبير الجيني في الفئران عبر الوراثية.

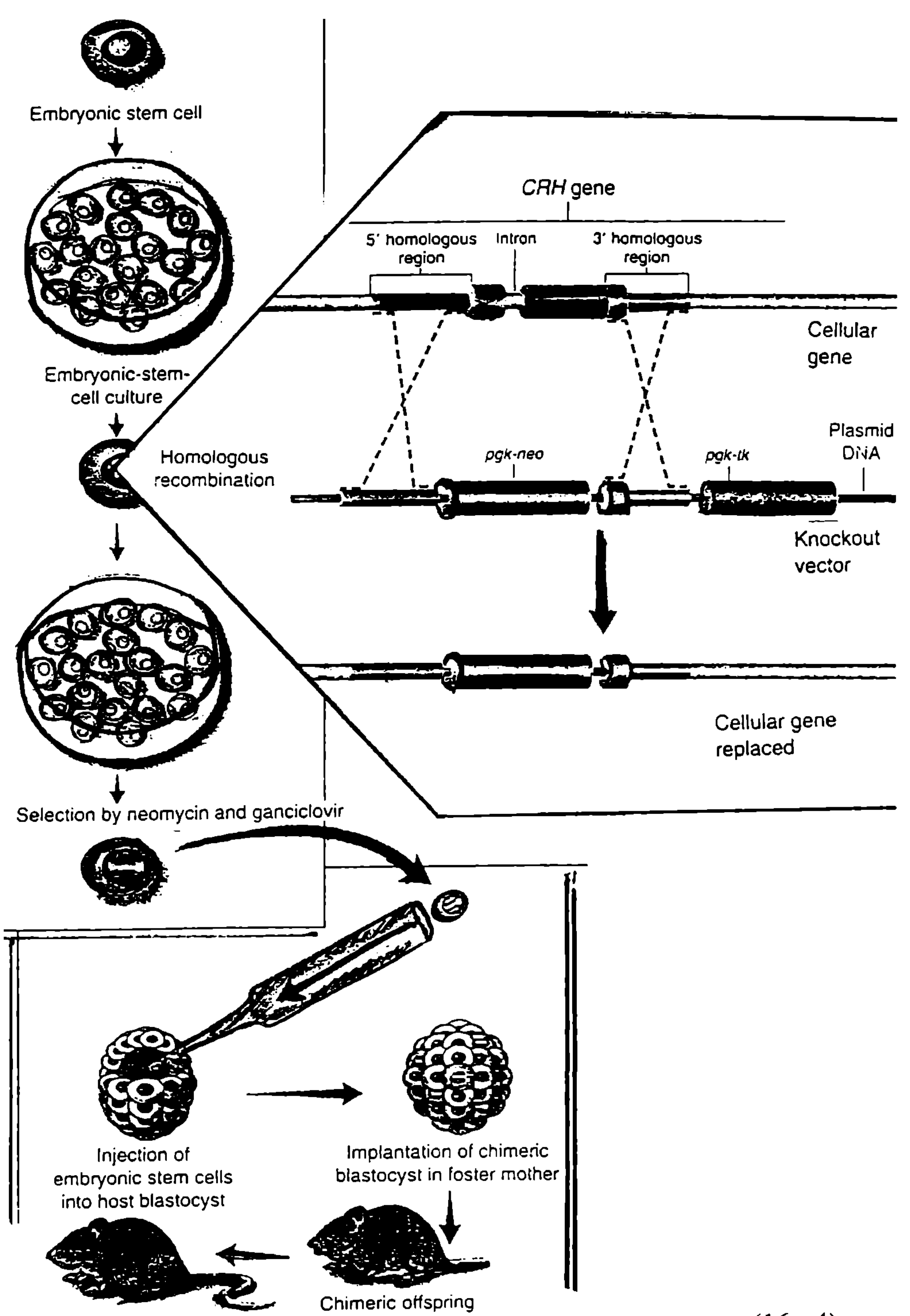
4 - 1 - 5 التأشيب الموقعي الموجّه :

يستخدم هذا النمط من التأشيب المتماثل Homologous Recombination في الحصول على حيوانات بطفرات مستهدفة في أحد الجينات الخلوية وبذلك يمكن دراسة تأثير غياب التعبير الجيني لبروتين ما يتم استهدافه دون غيره من الجينات تستخدم في هذه التقنية (الشكل 4 - 16) الخلايا الجذعية (ES) الحاوية على الجين المشفر للهرمون المحرر للكورتيكوتروبين (CRH) ويتكون من التتابع الفعال (الأكسون -1) والتتابع غير المشفر `5 يليه التتابع غير الفعال (الانترون)، ثم منطقة التتابع الفعال الثانية (الأكسون - 2) والمنطقة غير المشفرة `3 ، وتعتمد هذه التقنية على نوع فريد من النواقل تعرف بنواقل الاستهداف Knockout Vectors (تعرف كلمة Knockout بلغة الملاكمة بالضربة

حـسمـة) تتكون هذه النواقل من التجمع الخطي لمجـموعة شدف الدنا التي تصـل الشدفة 5 إلى الجينان المدمـجان (جين كايـناز الفوسفـوكليسريت مع جين النيـومايسين البكتـيري Pgk - Neo) مع وجـود شـدفـة تعليق Flanking Segment بين المنطقـة `3 مع الجين خلوي (CRH) والجـينان المدمـجان (كـايناز الفـوسفـوكلسـريت وجين كـايناز الـثـميـدين الفايروسي) (Pgk - tk) وبعـد إتمام تصنيع البنية الجـينية للنواقـل الاستهـدافيـة يتم إيلاج النواقل في مـزروع الخـلايا الجـذعـيـة الجنينيـة، حيث يحـدث تأشـيب مـزدوج Double Recombination بين الناقل الاسـتهـدافي والجين الخلوي (الأسهـم المقطعة) في منطقـتي التماثل `5 و `3 وينتج عن ذلك اندغام الـناقل الاستهـدافي الحاوي على التركـيب الجيني (Pgk - neo) دون التركيب (pgk - tk) في الموروث الخلوي للخلايا الجذعية الجنينية.

إن وجود التركـيب الجيني (Pgk - neo) وغياب التـركيب (Pgk - tk) في الجينات المستبـدلة (الإحلال الجـيني لجين مـا بدلاً من جين آخر) يمـكن أن يودي إلى بقاء الخـلايا الجذعـية الجنينية حـية عند الانتـخاب الإيجابي والسلبـي في الأوساط الحاوية على مـضاد الحـيوية النيـومايسين وعـقـار الكانسيكلوفـر Ganciclovir ولا بد هنا من التـوقف قليلاً للتطرق إلى كيـفية حـدوث عملية الانتـخاب، حيث يمثـل جين النيومايسين أحـد الجينات المسؤولة عن التـشفيـر للمقاومـة لمضاد الحيوية الـنيومايسين لذلك لن تنمـو أي من الخلايا الجذعـية في الـوسط الحاوي على المضـاد ما لم يكون الجين فـعال وظيـفيـاً وهذا يعني أن الاستبدال أو إحلال الجينات قد حدث، أما في حـالة عقار «الكانسيكلوفر» فإن هذا العقار يتحـول بواسطة أنزيم كايناز الثمدين إلـى مادة متأيضـة وسطية سامة للخـلايا الحاوية على جين الـ (tk) واعتماداً على هذه الصفة يمكن انتقاء الخلايا.

يتم حقن نسـيلة الخلايا الجـذعية الجنينيـة الطافرة في الكيسـة الأريمية للمـضيف ويتم بعدها غرس الكيسات الأريمية في أمهات مرضعات ذات حمل كاذب Pseudo Pregnant ويمكن الحـصول على هـذه الأمهـات المرضعـات ذات الحـمل الكاذب من خلال الـتهـيئـة الهرمونية لجعل الرحـم قادراً على استقبال البيوض والتصاقها بها وذلك بإجراء التزاوج بين هذه الإناث وذكـور مقطوعـة القناة الدافقـة للحـيامن (عـقيـمة) لغـرض تحفـيزها لإنتـاج الهرمونات بوسـاطة الجسم الأصغر Corpus Luteum ، ويمكن أن تتطور هذه الأجنة إلى ذرية كيمرية Chimeric offspring.



الشكل (4 - 16) : التأشيب الموقعي متماثل الأصل بين الجين الخلوي وناقل الاستهداف (Knockout Vector) لإنتاج فأر يفتقد للهرمون (CRH) المحررللكورتيكوتروبين Corticotropin Releasing Hormone.

4 - 2 الأهداف الاقتصادية للاستنسال البايولوجي:

على الرغم من أن بلدان العالم الثالث تمتلك حوالي 75 % من الحيوانات المنتجة للحليب واللحم في العالم إلا أن إنتاجها لا يتعدى 21 % من الإنتاج العالمي للحليب و 34 % من الإنتاج العالمي من اللحوم بسبب عدم اتباع الأساليب الصحيحة في الرعاية والإدارة وقلة المراعي ومصادر التغذية المناسبة وقلة الإنتاجية والكفاءة الوراثية وعدم تطبيق طرق متقدمة في التحسين الوراثي، ويعد التلقيح الاصطناعي في الأبقار مثلاً من الطرق المعتمدة عالمياً في الحصول على أبقار ذات إنتاجية عالية ومواصفات جيدة وذلك بتلقيح الأبقار تلقيحاً اصطناعياً بسائل منوي يتم الحصول عليه من ثيران منتخبة، حيث يمكن لثور محسن واحد أن يلقح أكثر من 10.000 بقرة خلال الموسم الواحد.

وبالرغم من أن أهمية هذه التقنية في الحصول على حيوانات مزرعة ذات نوعية وخصائص متميزة فإن الاستنسال بشقيه (الانشطار الجنيني واستنسال الخلايا الجسمية) واستخدام تقنيات التحوير الجيني يمكن أن يشكل مع التلقيح الاصطناعي ثورة وتقدماً غير مسبوق في هذا المجال خصوصاً في الإنتاج الكمي للخراف والأبقار وفي إنتاج حيوانات محورة جينياً قادرة على إنتاج البروتينات العلاجية. ولكن شيئاً من ذلك لن يتحقق بالتأكيد إلا بتوفر شرط في غاية الأهمية وهو تطوير كفاءة التقنية، حيث أن نسبة النجاح لم تتجاوز 3 % في معهد روزالين لغرض تقليل الكلفة الاقتصادية (بلغت كلفة إنتاج النعجة «دوللي» بحدود 650ألف دولار).

وأنفقت شركة PPL للعلاجيات 4 مليون دولار لإنتاج البقرة «روزي» Rosie المحورة جينياً لإنتاج حليب مدعم بالأحماض الأمينية. ويشير مسؤول إدارة البحوث في الشركة آلان كولمان (Alan Colman) إلى أن استخدام تقنيات الاستنسال سيوفر حيوانات محورة جينياً مستنسلة قادرة على إنتاج البروتين العلاجي المطلوب بكميات كبيرة (بسبب مضاعفة الجينات المسؤولة عن إنتاج البروتين لمئات أو آلاف المرات) مقارنة بالحصول على

خروف واحد أو اثنين فقط من كل عشرة خراف قادرة على إنتاج البروتين المطلوب للاستنسال وبذلك يكمن الهدف في إيجاد طرق سريعة وكفوءة لزيادة أعداد حيوانات معينة تكون لها سمات وصفات وراثية خاصة ومرغوبة، وعلى الرغم من النجاح المتحقق فإن الكثير من الاعتراضات تتم إثارتها من قبل جمعيات خاصة (الشكل 4 - 7) ترفض بشدة هذا النوع من التلاعب والتحوير الوراثي وتمارس الاحتجاج ضده.



الشكل (4 - 17): تشير التقنيات الحيوية الجديدة ومنها التطويع الجيني للحيوانات الاقتصادية الكثير من الاعتراضات والاحتجاجات من قبل جماعات الرفض (في الصورة إحدى هذه الجماعات) وهي تعلق الملصقات المندرة بالتطويع الجيني للأبقار التي تقوم بها شركة (Embrytec) الألمانية والتي تعمل على تطوير تقنيات الأجنة لحيوانات المزرعة.

4 - 3 الأنظمة المتقدمة لنقل الجينات:

نظام مسدس (إطلاق) الجينات "هيليوس":

هيليوس (Helios) كلمة تعني (إله الشمس في الميثولوجيا الإغريقية) وقد أطلقت ذكاء على نظام من أكثر الأنظمة تقدماً في إيلاج الجينات، ويمكن استخدامه بكفاءة عالية في تجارب التنبيغ (الاندماج الاستيعابي) Transfection وفي التلقيح بلقاحات الدنا DNA Vaccination والتمنيع الوراثي، حيث يمكن باستخدام هذا المنهج التقني إيلاج الجينات بدلاً من البروتينات ذات الحجوم الجزيئية العالية والمعقدة، ويحد من الحاجة إلى عمليات تنقية المعقدة للبروتينات ويتطلب كمية قليلة نسبياً من الدنا، ويمكن استخدام مسدس (إطلاق) الجينات في العلاج الجيني ونقل الجينات في الحي in vivo إلى الأنسجة والأعضاء المستهدفة لتصحيح الاعتلالات الوراثية ولعلاج الأمراض السرطانية والمخمجة، ويساعد في اكتشاف البروتينات العلاجية المحتملة والتعرف على الجينات المساهمة في تثبيط أو تحفيز وتعزيز نمو الأنسجة. تم تطوير هذا النظام في نقل الجينات بتعاون بين شركتي (Bio - rod) و (Auragen) وبالاعتماد على نظام أكسيل (Accell) ووحدة قذف الهليوم الباليستي Biolistic PDS 1000/He Bombardment PDS 1000، يتكون الجهاز (الشكل 4 - 18) من خرطوشة تحميل النموذج Loding Sample Cartridges الحاوية على 12 حجرة تعبئة وهي حاوية دائرية قابلة للإزالة والإرجاع إلى مكانها المخصص في أعلى الجهاز، تملأ الخراطيش بكميات محددة من الدنا وجزيئات (دقائق) الذهب المطلية بمادة ذات ألفة عالية للارتباط بالدنا أو الرنا ويعاد وضع الخرطوشة في مكانها. ويمكن استخدام الجهاز بكفاءة عالية في إيصال دقائق وجزيئات الذهب عالية الكثافة والمغطاة بالدنا أو الرنا، ويؤدي الانفجار القوي والفوري للهيلوم إلى دفع الدقائق المغطاة بالحامض النووي إلى اختراق الخلايا المستهدفة. يوفر هذا النظام إمكانية دراسة الأخماج الفايروسية التي تصيب النباتات والحيوانات ودراسة تنظيم فعالية الحفازات Regulation of Promoter Activity، ويمتاز نظام مسدس الجينات بكونه يوفر طريقة أكثر سرعة وبساطة لنقل الدنا والرنا من الحقن المجهري والتخلص من التأثيرات الجانبية غير المرغوبة التي تسببها النواقل الفايروسية، وتحد أيضاً من الاستجابة السمية التي تحفزها وسائط نقل الدنا المعتمدة على الدهون Lipid - based DNA Delivery.



Helios Gene Gun

الشكل (4 - 18): نظام هيليوس (مسدس الجينات) من الأنظمة المتطورة في إيصال الجينات إلى الخلايا المستهدفة.

الفصل الخامس

الاستنسال البايولوجي

(المحاولات الأولى)

5 ـ الاستنسال البايولوجي ... المحاولات الأولى

5 - 1 مقدمة:

لم يكن الإعلان عن استنسال «دوللي» وليد اكتشاف تقنية محددة أو ناتج عن انبثاق فكرة نظرية مجردة في خصوصيتها، ولم يكن في الوقت نفسه مفهوماً تقليدياً من مفاهيم هندسة التكاثر، بل كان نتيجة جهود مضنية واعتمد على تطور مجموعة التقنيات العائدة لعلوم متعددة، كالوراثة والهندسة الوراثية والفسلجة الحيوانية والأجنة والغدد الصماء وفسلجة التناسل، والكيمياء الحيوية، وتحسين الحيوان والأنسجة، والزراعة النسيجية.

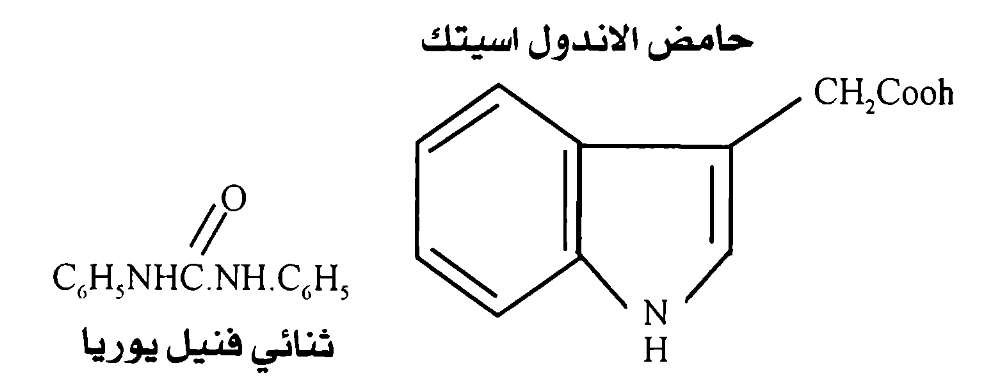
ولا بد لنا وقبل الولوج في المحاولات الأولى للاستنسال البايولوجي من التطرق إلى بعض الأساسيات في علم الخلية، هذا التركيب المدهش المليء بالأسرار، والمعجزة الألهية في الاستنسال والتضاعف والتكرار، ومن هذه الحقائق عدم وجود ارتباط أو علاقة بين الانقسام الخلوي المتتابع وبين نوع الخلية الحية أو بموقعها من الكائن الحي، حيث تتشابه جميع الخلايا الحية في قدرتها على الانقسام المتتابع في حالة توفر بعض الظروف الملائمة في البيئة المحيطة بها، وتمكن العلماء من إثبات صحة هذه الحقيقة بصورة عملية من خلال تحويل بعض الخلايا النباتية البالغة والمتوقفة عن الانقسام منذ زمن بعيد إلى خلايا دائمة الانقسام ونامية بنشاط.

ونجح العلماء في استنبات نباتات كاملة تعود إلى نفس النوع بدأ من خلايا نباتية مفردة، ويمكن الاستنتاج من هذه التجارب بعدم وجود شيء خاص في البويضة المخصبة (والتي ربما تكون أقل الخلايا الحية تخصصاً) له علاقة سببية مباشرة ومحددة بآلية الانقسام المتتابع، وبينت تجارب أخرى أجريت على شرائح من جذور نبات الجزر (عادة ما تكون خلايا الجذور في هذا النبات فاقدة للقدرة على الانقسام والنمو في الظروف الاعتيادية).

ومن بين مجموعة متعددة من الأوساط الغذائية المختلفة التي استخدمت في تنميتها، كان لوسط حليب جوز الهند (السائل الذي ينمو عليه جنين نبات جوز الهند) فعالية كبيرة في تحفيز إطلاق آلية الانقسام المتتابع في خلايا جذور الجزر، وأدت إلى تضاعف وزن هذه الشرائح بحدود 80 مرة خلال 20 يوماً فقط، وفي الحقيقة فإن هذا التحفيز كان انتقائياً إلى حد كبير في الوقت الذي دفع فيه خلايا جذور الجزر إلى النمو بجنون بإطلاقه لآلية خاصة كانت ساكنة أو هامدة في الظروف الاعتيادية فإنها لم تؤثر في درنات البطاطا، في حين أظهرت خلاصات نباتية أخرى كخلاصة خلايا البصل تثبيطاً أدى إلى إيقاف عملية النمو بصورة كاملة.

ولا بد هنا من الإشارة إلى أن قدرة الخلايا الاعتيادية على النمو والتحول إلى نبات كامل تقود إلى الاستنتاج بأن هذه الخلايا ومهما كان موقعها تحتوي على نفس المادة الوراثية (الحامض النووي DNA) الموجودة في البويضة المخصبة والقادرة على تكوين الكائن الحي الكامل.

وحيث إن أغلب أنواع الخلايا تعد من الخلايا المتخصصة فإن هذا يعني أن نظاماً بالغ الدقة يسمح باستخدام جزء من هذه الذخيرة الوراثية والذي يتلائم مع وظيفة هذه الخلايا وتخصصها ولا يسمح باستخدام الجزء المتبقي من هذه المعلومات، وهنا يبرز التساؤل حول السبب في عدم تحول الخلايا الجسمية إلى أجنة؟ وماهي آلية السيطرة الجنينية التي تحكم تصرفاتها وتتحكم في انقساماتها وتجعلها تؤدي مهام وظائفها حصراً؟ ووجد العلماء أن الاختلافات بين هذه الخلايا وبين البويضات المخصبة يتمثل في طبيعة الوسط المحيط بهما والذي ربما يعود إليه العامل المحدد لطبيعة وظيفة كل منهما، وحيث أن وسط حليب جوز الهند أظهر تحفيزاً للانقسام المتتابع، فقد تم تحليل مكوناته ووجد أنه يحتوي على مركبات كيميائية محفزة للانقسام المتتابع المذكور ووجد من ضمنها مادتين تدخل ضمن مجموعة الهرمونات النباتية وهي مادة حامض الأندول استيك وثنائي يوريا (الشكل 5 - 1) مع وجود مركبات (معضدة) مساعدة أخرى كالكحولات متعددة مجاميع الهيدروكسيل والتي تزيد من فعالية ونشاط الهرمونات النباتية في حالة وجودها معها.



الشكل (5 - 1) : التركيب الكيميائي لبعض المحفزات النباتية الموجودة في وسط حليب جوز الهند.

وتتواجد هذه المركبات في الوسط المحيط بالجنين والمعروف بالأندوسبرم، وهي التي تدفع البويضة المخصبة وخلايا الجنين إلى الانقسام المتتابع. وهنا يبرز التساؤل التالي: هل ينطبق الأمر نفسه على الكائنات الحية العائدة إلى المملكة الحيوانية؟ ووجد أن الجواب كان بالإيجاب فهناك العديد من نقاط التشابه بين الخلايا الحيوانية والنباتية والتي تتمثل بعدم تخصص البويضة المخصبة واحتواء الخلايا الجسمية على ذات المعلومات الوراثية والتي تحوي جميع المقومات اللازمة لتكوين الكائن الحي الكامل ووجود آلية سيطرة على التعبير الجيني تسمح بالتعبير الانتقائي للمعلومات المتعلقة بوظائفها التخصصية فقط، وأخيراً وجود الهرمونات الحيوانية والتي تعمل في الأحياء الراقية كاللبائن كمواد محفزة وحاثة Inducers لفعالية المورثات وذلك من خلال آلية التأثير على المورثات المنظمة، فبعض العوامل الحاثة كأنزيم التايروسين - A- كيتوكلوتاريت ترانس أميناز يزداد تركيزه بسرعة في الساعات القليلة قبل الولادة وله علاقة بالكورتيزون الذي تفرزه الغدة الكظرية.

وأجريت تجارب عديدة لتوضيح تأثير السايتوبلازم على فعاليات النواة، فمعظم خلايا الكائن الحي تكون متخصصة للقيام بوظائف محددة وبالتالي فإن مورثات معينة ذات العلاقة المباشرة بوظيفتها هي التي تكون فعالة. أما أغلب المورثات الأخرى فتكون في حالة سكون وغير فعالة وبينت تجارب الخلايا الهجينة Hybrid Cells وهي خلايا

حاوية على نواة غريبة من مصدر مغاير للمصدر الذي تعود إليه الخلية المهجنة ونواتها الأصلية، إن النواة الغريبة قد استجابت لمحفزات السايتوبلازم مما أدى إلى كبر حجم النواة وتصنيع أنواع من الرنا المرسال الجديد، وقد أمكن التوصل إلى نتائج مماثلة في التجارب التي تضمنت نقل نواة نوع متخصص من الخلايا إلى خلية غير متخصصة وأزيلت نواتها مسبقاً، حيث استجابت النواة المنقولة من النوع المتخصص ،وأنتجت الرنا المرسال وبروتينات جديدة وتمكنت النواة المنقولة من التحكم بالسيرورات المختلفة لفعاليات الخلية. وبذلك توصل العلماء إلى استنتاج بالغ الأهمية وهو عدم خصوصية السايتوبلازم تجاه نواة نوع معين من الخلايا وإن محفزات السايتوبلازم تمتلك القدرة على تحفيز الجينات لأية نواة أخرى منقولة إليها، وبينت تجارب أخرى أن إتلاف خلية واحدة من بويضة منقسمة إلى خليتين فإن الخلية الثانية تكون جنيناً كاملاً.

وأجرى العالم الألماني «سبيمان» تجربة رائدة أثبت فيها أن نواة واحدة بعد عدة انقسامات يمكن أن توجه عملية تكوين كائن حي كامل، وكانت فكرة التجربة غاية في البساطة والذكاء، إذ وضع هذا العالم الذ ذ خيطا حول البويضة المخصبة وشده بقوة جعلت الخلية تتخصر إلى نصفين غير منفصلين أحدهما يحتوي على النواة والآخر على السايتوبلازم فقط، وبقيت النواة تنقسم في أحد النصفين مكونة مجموعة من الخلايا إلى أن تمكنت نواة واحدة من العبور إلى النصف الثاني (الحاوي على السايتوبلازم) وعندذلك عمل «سبيمان» على فصل هذا الجزء عن بقية كتلة الخلايا ولاحظ أنه يمكن أن يكوّن كائناً كاملاً.

إن العلاقة بين الرنا المرسال ومراحل النمو الجنيني المبكر لخلايا البيضة ودورهما في التعبير الجيني اللازم للنشوء والتطور تتطلب إلقاء الضوء على عملية تكون البيضة، فعندما تصل الخلايا الجنسية في الجنين الأنثى إلى المبيض البدائي (في طور التكوين) تشكل كتلا خلوية منتشرة بين الأنسجة الرخوة، وبعد ذلك تتفرق وتنتشر وتمر بمراحل نمو سريع ينتهي قبل ولادة الجنين وتتحول الخلايا الجنسية لتصبح الخلايا البيضية الأولية Primary Oocyte) وهي في اللبائن محاطة بالخلايا الجريبية Follicular Oocyte، بعدها تدخل خلايا البيضية الأولية مرحلة الانقسام الاختزالي الأولى قبل الولادة وتتوقف في الطور

تمهيدي وتبقى كذلك حتى بلوغ سن المراهقة، عندها تبدأ هذه الخلايا بالنمو على دفعات دورية (في اللبائن) وبفترات ثابتة في الإنسان (كل 28 يوماً تقريباً) وعادة ما تصل واحدة منها فقط إلى النضوج في كل مرة، تبدأ الخلية البيضية الأولية في مواصلة عملية الانقسام الاختزالي الأول وفي الوقت نفسه تنمو وتزداد حجماً وتتحفز مراحل النضوج في خلية البيضة بتأثير هرمون تفرزه الغدة النخامية يدعى الهرمون المحفز للجريب Folic ular Stimulating Hormone وفي مراحل نمو البيضة هذه تنشط عملية تكوين الرنا المرسال m - RNA، حيث تكون بعض جينات النواة فعالة خلال هذه المراحل، ويتم خزن هذه الجزيئات في السايتوبلازم لفترة من الزمن قبل استعمالها لتكوين البروتينات بعد عملية الإخصاب والانفلاق. ولا بد لجزيئات الرنا المرسال أن تتوقف عن أداء وظيفتها بعد فترة زمنية قصيرة منعاً لحدوث الترجمة والتي تؤدي إلي فرط إنتاج البروتين المشفر له من قبل هذا الرنا المرسال وزيادة معدل تعبير الجين المشفر للبروتين يودي إلى خلل تنظيمي كبير في المراحل الحساسة والمبكرة من نمو الخلية، مما يثير الدهشة أن جزيئات الرنا المرسال الموجود في سايتوبلازم خلية البيضة يشكل حالة استثنائية من حيث مدى البقائية وطول العمر.

إن هذه الخصوصية تنبع من كون هذه الجزيئات محمية من تأثيرات أنزيمات الإتلاف إضافة إلى كونها محاطة ببروتين يحميها من التأثيرات الأخرى، وأثناء نضوج خلية البيضة فإن جزيئات الرنا المرسال الحاملة للشفرة الوراثية أو للإشارة الضرورية لانقسام هذه الخلية بعد أخصابها ستتوافد من النواة إلى السايتوبلازم وسرعان ما تصبح جزيئات الرنا المرسال المسؤولة عن الانقسام وتخليق هياكل خلوية جديدة فعالة. وأجريت تجارب لغرض التأكد من المعلومات الوراثية المخزونة في السايتوبلازم، حيث تمت إزالة أنوية بويضات البرمائيات، ووخزها بإبرة لتحفيزها على الانقسام بدون نواة، وهذا ما حدث فعلاً، ولكن بعد عدد من الانقسامات، ماتت الخلايا ومن المحتمل أن ذلك الموت كان نتيجة لنفاذ الرنا المرسال المخلق سابقاً عند وجود النواة قبل إزالتهاو وعدم تجدده بغيابها.
يتم الانقسام الاختزالي الأول للخلية البيضية الأولية بشكل يجعل أحد الخلايا الناتجة (البنوية) صغيرة الحجم جداً ولا تحتوي من السايتوبلازم إلا على كمية ضئيلة للغاية،

وتدعى هذه الخلية بالجسم القطبي الأول، وتنضج البيضة وتتحول إلى الخلية البيضية الثانوية Secondary Oocyte التي تدخل مباشرة مرحلة الانقسام النضوجي الثاني، وقبل إكمال هذا الانقسام تتحرر البيضة (في اللبائن) من المبيض وتسمى الحالة الإبياض Ovulation ، ولا يكتمل الانقسام الثاني إلا بعد حصول الإخصاب، وتكون البيضة عند اطلاقها محاطة بغشاء من المواد اللاخلوية وإلى الخارج منها طبقة من الخلايا الساندة، أن نضوج البيضة يعني قابليتها على بدء عملية التكوين الجنيني عند تحفيزها بعملية الإخصاب، وتتحول الحويصلة (البويضة + طبقة من الخلايا الطلائية المسطحة) إلى غدة صماء تدعى الجسم الأصفر.

وفي حالة عدم حصول تخصيب للبويضة فإن الجسم الأصفر يضمحل وعلى عكس ذلك فإنه ينمو ويفرز الهرمونات كالبروجسترونات التي تساعد على انجاح الحمل ويوجد حوالي 500.000 حويصلة في مبيض الأنثى ولكن عدد هذه الحويصلات يبدأ بالتناقص تدريجياً ويصل إلى 15000 عند وصول الفتاة إلى سن البلوغ وتحتوي كل حويصلة على بويضة ولكن لا ينضج من هذه البيوض سوى عدد ضئيل 300 - 400 بيضة وبمعدل واحدة بالشهر ولمدة 30 عاماً تقريباً حتى الوصول إلى سن اليأس، وفي الحقيقة فإن جميع الحيوانات تتنامى من خلية بيضة مخصبة واحدة، يمكن أن تمر في دورات عديدة من الانقسام لتعطي غالباً ملايين الخلايا الجنينية، التي تنتظم معاً وبتناسق مدهش وبديع لتكوين الكائن الحي الكامل، نظام تتكامل فيه العظام والجلد والعضلات والدماغ في وحدة شديدة التناسق مشكلة انجازاً بالغ الدقة والوضوح لظاهرة التنظيم الذاتي.

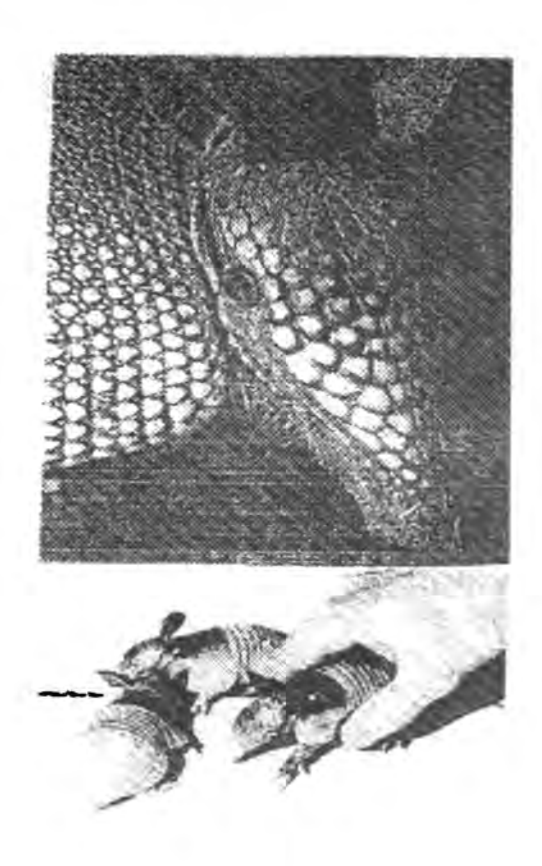
وتشكل ظاهرة التوائم أحد الأمثلة الرائعة للتناسق المدهش الذي يعمل فيه النظام الحي، إذ عندما تكون الأم في حالة طبيعية فإن أحد المبيضين يعمل كل شهر وينتج بيضة هذه البيضة هي واحدة من 20 بويضة يتحسسها جسم الأنثى ويختارها على أساس أنها الأفضل. وفي الشهر الثاني يرتاح المبيض الأول وينتج المبيض الثاني بيضة، ولكن في حالات أقل حدوثاً يمكن لكلا المبيضين أن ينتجا بيوضاً وتلقح كل بيضة بحيمن وتكون التوائم في هذه الحالة غير متماثلة. أما إذا كان هناك بيضة ملقحة واحدة وتنقسم إلى خليتين تنمو كل منهما على حدة فتدعى التوائم في هذه الحالة بالتوائم المتماثلة. ويثير

حيوان المدرع الأمريكي (الشكل 5 - 2) الدهشة، إذ أن عدد مواليده دائماً أربعة وكلها من يضة واحدة بالأصل، فعند تزاوج أنثى هذا الحيوان تتخصب بويضة واحدة فقط، سرعان ما تنمو إلى جنين والذي ينقسم في طور مبكر جداً من التكوين إلى اثنين، وهذه بدورها تنقسم مرة أخرى لتكوين أربعة أجنة حاوية على نفس المورثات والصبغيات وبصورة أربعة توائم أو قرائن يتم إنتاجها بالانشطار الجنيني للبيضة المخصبة.

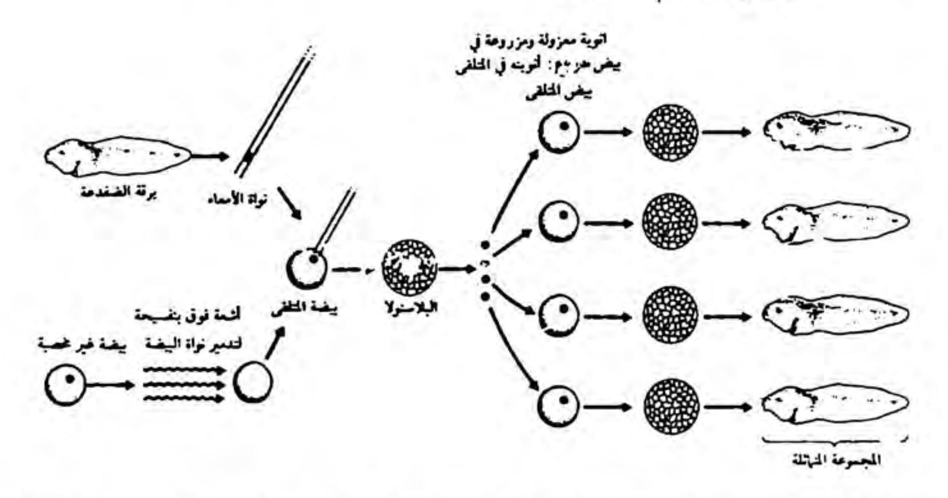
5 - 2 البداية المبكرة لتجارب الاستنسال:

تعود البداية الحقيقية لتجارب الاستنسال Cloning أو التكاثر اللاجنسي النسيلي إلى عام 1952 حين تمكن العالمان روبرت بريكز (Robert Briggs) وتوماس كنك (Thomas King) من إجراء أول عملية استنسال لضفادع من خلايا لفرخ الضفدع أو الشرغوف Tadpole، وفي عام 1962 تمكن العالم جون كوردون (Gohn Gurdon) من إنتاج الضفادع الإفريقية من خلايا الشرغوف أكبر حجماً، (الشكل 5 - 3) باستخدام التكاثر النسيلي اللاجنسي (الاستنسال)، وذلك بالحصول على بيضة غير مخصبة من ضفدعة إفريقية وعمل على تحطيم نواتها بالإشعاع (استخدم الأشعة فوق البنفسجية «يمكن استخدام وسائل أخرى لإزالة وتحطيم نواتها كاستخدام مادة الكولجيسين أو إزالة النواة بالتطويع والجراحة المجهرية)، استبدل «كوردون» بعد ذلك نواة البيضة الأحادية بنواة ثنائية من خلايا أمعاء فرخ الضفدع، وبدأ بعدها البيض الحاوي على المجموعة الكروموسومية الثنائية المكتسبة في الانقسام كما لو كان قد تم تخصيبه ومرّ بالأطوار الجنينية إلى أن وصلت في بعض الأحيان إلى ضفادع بالغة كاملة، وقد استقبلت هذه الخلايا كل مادتها الوراثية من خلايا أمعاء فرخ الضفدعة (كواهبة للنواة) وذلك بدلاً من إنتاج ضفادع تحتوي على المادة الوراثية لكلا الأبوين، ونظراً لحصول الباحث على توائم (متماثلة) لفرخ الضفدع الواهب والذي يظهر مسبقاً للوجود قبل ذلك بعدة شهور.

فقد أمكن إثبات أن المادة الوراثية التي تحتويها نواة خلية متخصصة عالية التشكل، استطاعت أن توجه النمو، حتى اكتمال نموها لتصبح ضفدعة كاملة طبيعية، وبينت النتائج أيضاً أن الضفدع الواهب للنواة (المادة الوراثية) يمكن أن يكون الأب الوراثي لعدة آلاف من النسل المتماثل وراثياً.



الشكل (5 - 2): حيـوان الـمدرع الأمـريكـي (الأرماديلو) عـدد مواليـده الثابت غالباً ما يثيـر اهتمـام العلماء.



الشكل (5 - 3): تقنيـة الاستنسـال التي استـخدمت في الحصـول على نسائـل متمـاثلة من أفراخ الضفدع الإفريقي.

وأجريت تجارب أخرى على خلايا متخصصة عالية التشكل للضفدعة، ووجد أن مدتها الوراثية أو أنويتها يمكن أن توجه النمو لتوائم أخرى من الضفادع إذا ما زرعت في بيض مناسب منزوع منه الأنوية، وهذه الخطوة ضرورية للحصول على توأم متماثل وراثياً من النسل ومماثل للخلايا الجسمية للكائن الحي الواهب.

إن معدل نجاح التجارب المجراة على الضفادع كان منخفضاً جداً وإن إمكانية تطبيقه على بيض الإنسان بالتأكيد سوف يكون أكثر صعوبة. كذلك تمتاز تقنيات نقل وزرع الأنوية وعمليات النمو في اللبائن بكونها أكثر تعقيداً عنها في البرمائيات، حيث أن النمو يحدث في جسم الأم وليس في مزارع مختبرية، كما تتطلب عملية إزالة الأنوية واستبدالها بأنوية ثنائية المجموعة الكروموسومية من الخلايا الجسمية مهارة كبيرة ودقة متناهية وأجهزة متقدمة مع ضرورة الحصول على بيض الثدييات بطرق لا تحدث الضرر فيها والحفاظ على حيويتها واستمراريتها وبقائها لحين إجراء التجارب عليها، ويتطلب أيضاً تطوير تقنيات خاصة في علم نقل الأجنة Embryo transfer والذي مكن الإنسان من التدخل بصورة أكثر براعة في العملية التكاثرية وتطويعها لمصلحته في زيادة الإنتاج وتحسن النوع.

تمكن العلماء بنجاح من عزل بيوض الفئران وإخصابها في أنابيب الاختبار حتى بلغت مرحلة الكيسة الأريمية، زرعت بعدها في أرحام فئران مستلمة حتى موعد الولادة الطبيعي، وتمكن العلماء من استخدام مادة الكولجيسين Colchicine (الشكل 5 - 4) في إزالة أنوية الفئران. تعد مادة الكولجيسين التي عرف دورها في تثبيط تكوين المغزل خلال الانقسام الخلوي لأول مرة عام 1930 من القلويدات السامة شدية المفعول يستخرج من نبات اللحلاح أو الزعفران الكاذب Colchicum .

وقد تمكن الصيدليان الفرنسيان الشهيران بيرتتير وكوفنتو من فصله من النبات عام 1820 ، يستخدم الكولسيمايد Colcemide (N - deacetyl N - methyl Colchicine) في تثبيط التيوبيولين وتكوين المغزل ويقيد الانقسام الخيطي عند الطور الاستوائي والتركيز المناسب للكولجيسين يتم تحديده تجريبياً في كل حالة وهو فعال في مدى واسع من التراكيز ولمعظم خلايا اللبائن في المزارع النسيجية فإن التراكيز الفعالة تتراوح بين 5-10 مولار إلى 7-10 مولار.

الشكل (5 - 4): التركيب الكيميائي للكولجيسين

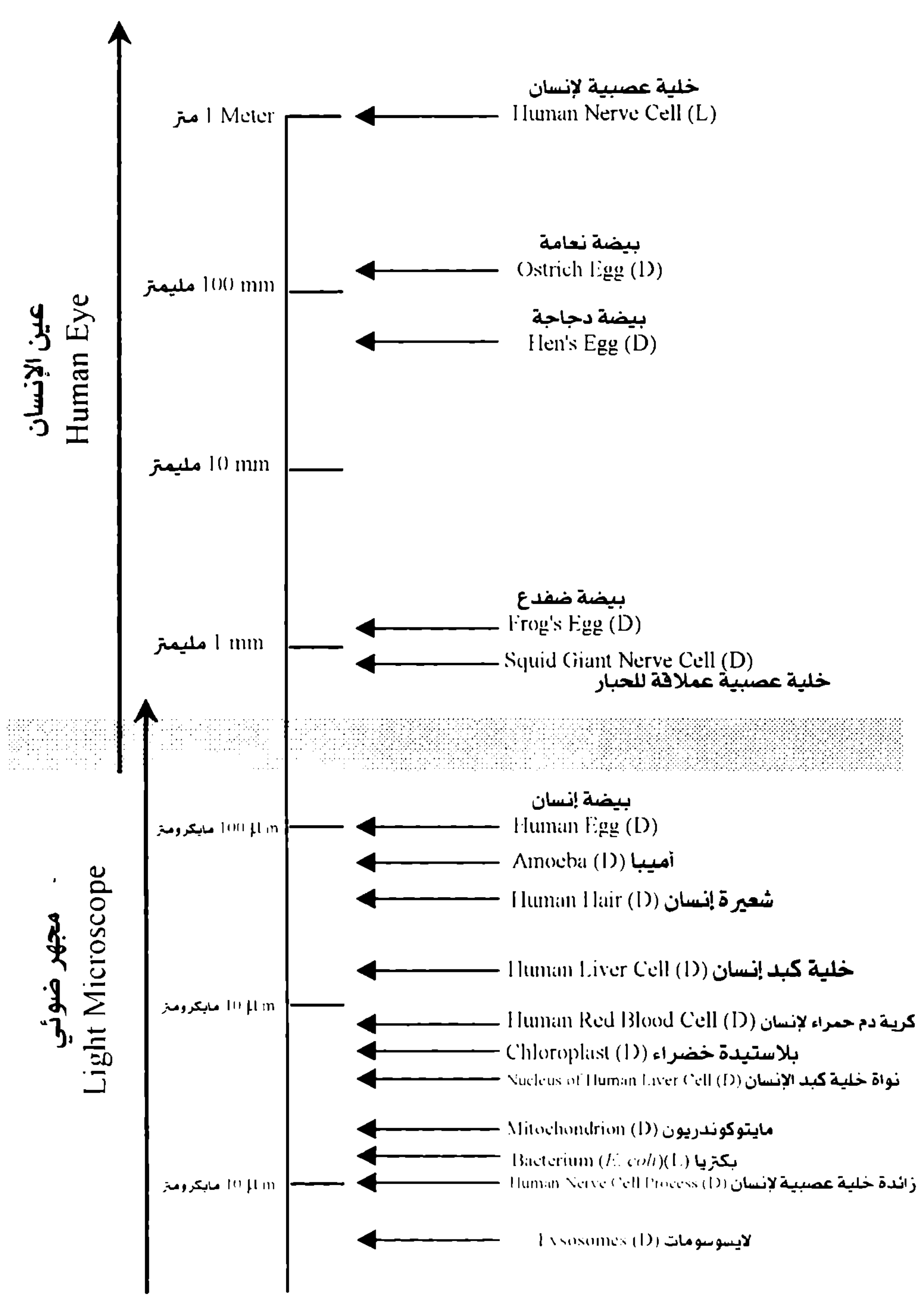
ومن الطرق الأخرى لإيلاج النواة الثنائية المجموعة الكروموسومية إلى البويضة الخالية من النواة هو عن طريق اتحاد الخلايا في المزرعة باستخدام بعض الفايروسات العائدة لمجموعةParamyxovirus كفايروس سنداي Sendai Virus وهو الاسم المرادف لفايروس Parainfluenza murine Virus type I ويعزل من البيوض المجننة Embryonated eggs وقد نجحت التجارب على الحيوانات غير العائدة لمجموعة الثدييات وعند إجرائها على الأخيرة واجهت العلماء بعض المشاكل والتعقيدات بسبب وجود الغلاف أو الغطاء الحامي للبيضة Zona Pellucida وهو غشاء مطاطي صلب وسميك يغلف البيضة، حيث وجد أن الخلايا الجسمية المتحدة بالبيض تنقسم عدة مرات ولكنها لا تنمو إلى كيسة أريمية بسبب وجود الغطاء الحامي للبيضة آنف الذكر. وقد بينت التجارب التي أجريت على الضفادع أن نجاح استنسال الضفادع كان يعتمد أساساً على زرع النوع الصحيح من الأنوية في خلية البيضة، إذ يجب أن تكون سرعة انقسام النواة الجديدة متناسبة مع السرعة الأصلية لانقسام خلية البيضة وعند عدم حدوث مثل هذا التناسب والتناسق فإن اختلاف سرعة الانقسام سوف ينتج كائنات حية مشوهة وغير كاملة، حيث من الضروري إيجاد تزامن أو (تواقت) بين سايتوبلازم البيضة ونواة الخلية الجسمية، أي جعلهما تنقسمان بالسرعة نفسها، أذ تمتاز خلية البيضة بسرعة انقسامها، في حين تكون معظم الخلايا

حسمية أبطأ انقساماً من البيضة، وينتج تحفيز أو تنشيط السايتوبلازم لنواة الخلية الجسمية حتى الانقسام قبل أن تكون الأخيرة مهيأة للانقسام حدوث تكسر في الصبغيات (كروموسومات). ولتلافي هذه المشكلة يستخدم العلماء خلايا جسمية ذات أنوية أسرع انقساماً كالخلايا الجلدية أو الدموية أو خلايا الضرع.

وتمتاز بيوض الثدييات أيضا بكونها أصغر حجماً (الشكل (5 - 5) وأسرع تلفاً ويحتاج نقل وزرع الأنوية فيها من دون إتلافها إلى الحرص الشديد وإجراء العملية بالتطويع المجهري للخلايا. وقد تأكدت هذه الحقائق حين لم تحقق التجارب التي أجريت لاستنسال الأرانب نتائج مرضية، وقد نمت بعض الأجنة نمواً شاذاً.

تمكن العلماء منذ عدة سنوات من إنتاج فئران لها أربعة آباء وتم ذلك بأخذ الأجنة في طور الثماني خلايا من أبوين من فأرين مختلفين حاملين، وتربية تلك الأجنة في بيئة صناعية، فإذا دفعت إحدى تلك الأجنة للتصادم مع أخرى في ذات البيئة الصناعية فإنها تلتحم معها في جنين واحد، وبعد فترة أخرى من النمو يزرع هذا الجنين المتحد في أم حاضنة ويترك لينمو نمواً طبيعياً وتنشأ بعض خلايا كل عضو في هذا الجنين المبرقش أو الموزائيكي Mosaic من زوج من الآباء والبعض الآخر من الزوج الآخر من الآباء، ويعرف هذا الفأر بالفأر رباعي الوالدين.

وتمكن العلماء من تطوير تقنية زرع أو غرس الأنوية للحصول على نسائل متماثلة ومتطابقة من الفئران (الشكل 5 - 6) يتم في هذا الأسلوب جمع الأكياس الأريمية (البلاستوسيت) من فأر مانح رمادي اللون وإزالة الغطاء الواقي وعزل كتلة الخلايا الداخلية (ICM) وفصل الخلايا وتفريقها وباستخدام تقنية الحقن النووي المجهري، يتم حقن إحدى هذه الخلايا في بيضة مخصبة يتم جمعها من فأرة مانحة سوداء اللون، تزال كلا الأنوية الأولية للبيضة المخصبة ولا يتم الإبقاء سوى على الخلية المنقولة، تنمى هذه البيضة الحاوية على الخلية المنقولة في وسط زرعي خارج الحي لحين وصولها إلى مرحلة البلاستوفور، تغرس بعدها في رحم فأرة مهيأة هرمونياً بيضاء اللون، حيث حصل العلماء على فئران رمادية اللون (اللون الأصلي للفأر المانح للخلية المنقولة).



الشكل (5 - 5): تتباين أحجام البيوض وتختلف باختلاف النوع أكبرها للنعام وتكون بيضة الإنسان أصغر حجما وأسرع تلفا من الأنواع الأخرى.

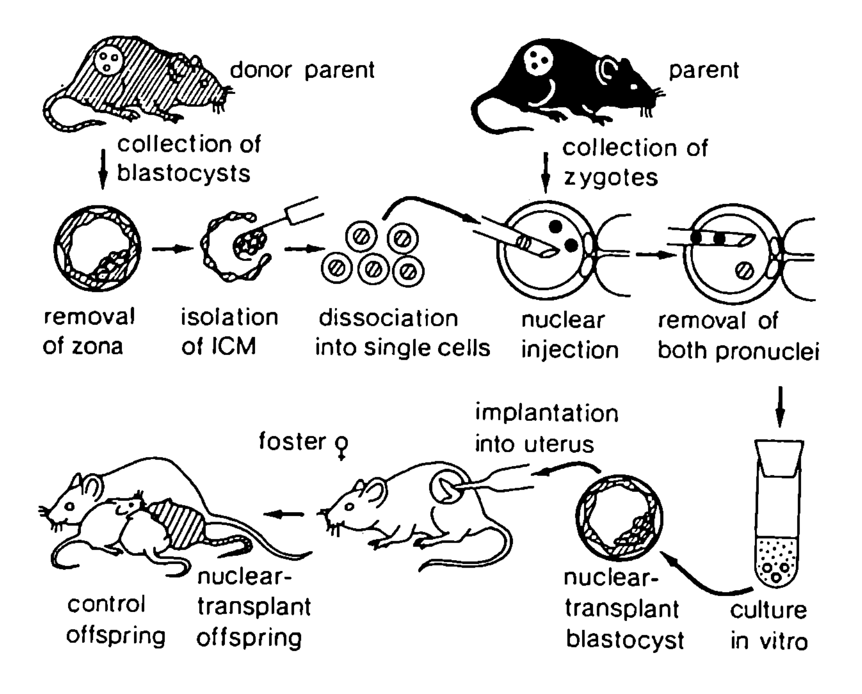


Diagram of the nuclear transplantation experiment

الشكل (5- 6): مخطط يوضح تجربة زرع أو غرس الأنوية nuclear transplantation لإنتاج نسائل متماثلة من الفئران.

ونجح الباحثان كارل المنسي وبيتر هوب في عام 1979 من إنتاج ثلاثة فئران بطريقة زرع الأنوية (الشكل 5 - 7).

وكان الفشل قد أصاب تجاربهما و لـ 363 مرة، ثم حالفهم النجاح بعد ذلك، وقد تمكن هذين الباحثين من إنتاج توائم وثلاثيات Triplets متماثلة بعد زرع أنوية من نفس المتبرع في عدة بويضات منزوعة الأنوية، ونجحا في إنتاج نسائل (كلونات) من الفئران.

قطعت التجارب المتعلقة بالفئران شوطاً كبيراً وذلك بسبب سهولة التطويع الوراثي لبيوض وأجنة الفئران، ولم يتحقق تقدم مماثل على صعيد الحيوانات الاقتصادية.

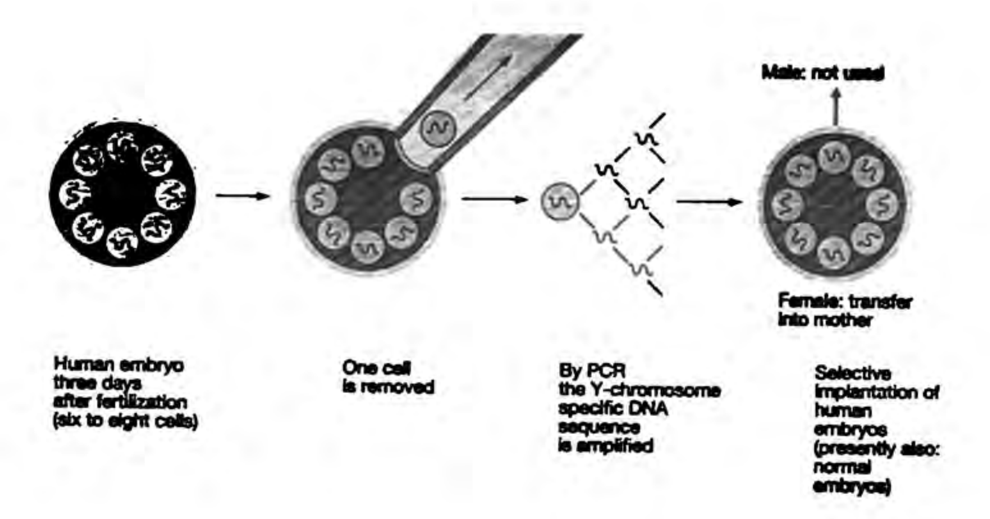


Three mice produced by nuclear transplantation

The three mice thus produced included two gray mice and one with the agouti color (right).

الشكل (5 - 7): ثلاثة فئران أنتجت بالنقل النووي من قبل العالم كارل المنسي والعالم بيترهوب.

الاستنسال مصطلح يعني الحصول على (نسائل متطابقة تماما من الناحية الوراثية)، ويمكن للاستنسال أن يحدث بطريقتين أساسيتين: الأولى باستنسال الخلايا الجسمية المتخصصة، أما الثانية فتتم باستخدام طريقة الانشطار الجنيني وهو عملية اقتطاع مجموعة من الخلايا الجنينية من أجنة في الأطوار المبكرة من النمو الجنيني أحد الوسائل المهمة في الحصول على نسائل متطابقة تماماً من حيث المحتوى الوراثي، وكذلك في تشخيص جنس الجنين وباستخدام تقنيات الهندسة الوراثية واعتمادا على الخلايا الجنينية المقتطعة من الجنين (الشكل (5 - 8). وفي عام 1993 تحقق إنجاز كبير، وفي غاية الأهمية. إذ تمكن علماء الأجنة فيجامعة واشنطن من استنسال أجنة بشرية، وذلك بأخذ خلايا من 17 جنين بشري، ومن كل من (2 - 8) خلايا متماثلة بالحجم ثم اقتطاعها من الأجنة، نميت كل خلية من الخلايا في طبق مختبري وحصلوا على أجنة من 32 خلية وهو الحجم الملائم الذي يمكن غرسه أو زرعه في رحم المرأة. وقد أثارت هذه التجربة ضجة إعلامية كبيرة وأثارت الكثير من الاعتراضات الأخلاقية والتي سوف يتم التطرق إليها بالتفسيل في الفصل الثامن.



(A)

(B)

الشكل (5 - 8):

A - التشخيص ما قبل الغرس يعتمد على إزالة أحد الخلايا الجنينية من الجنس البشري بعد مرور ثلاثة أيام من الإخصاب، حيث يتكون الجنين من 6 - 8 خلايا) وباستخدام تقنية التفاعل السلسلي لأنزيم بلمرة الدنا PCR يتم تضخيم التعاقبات النوعية للكروموسوم الذكوري Y، حيث يمكن انتقاء الأجنة (ذكور أم إناث).

B - يمكن الحصول على توائم متعددة من جنس واحد بفضل التقنيات الحديثة لعلم الإخصاب والأجنة.

وفي عام 1993 تحقق إنجاز كبير، وفي غاية الأهمية. إذ تمكن علماء الأجنة في جامعة واشنطن من استنسال أجنة بشرية، وذلك بأخذ خلايا من 17 جنين بشري، ومن كل من (2 - 8) خلايا متماثلة بالحجم ثم اقتطاعها من الأجنة، نميت كل خلية من الخلايا في طبق مختبري وحصلوا على أجنة من 32 خلية وهو الحجم الملائم الذي يمكن غرسه أو زرعه في رحم المرأة. وقد أثارت هذه التجربة ضجة إعلامية كبيرة وأثارت الكثير من الاعتراضات الأخلاقية والتي سوف يتم التطرق إليها بالتفسيل في الفصل الثامن.

5 - 4 استنسال القرود ... الخطوة الأولى نحو استنسال البشر:

شكل الإعلان عن نجاح استنسال القرود من الخلايا الجنينية من قبل العالم دونالد وولف (Donald Wolf) من مركز أوريغون الإقليمي لبحوث الرئيسيات (الرئيسيات رتبة من الثدييات يعود لها الإنسان والقرود) Oregon Regional Primate Research Center خطوة جديدة متقدمة لتقنيات هندسة التكاثر الجديدة تجاه توفر إمكانيات القدرة الجامحة للإنتاج الجماعي للإنسان، وحقق هذا الإنجاز نقلة نوعية لتقنيات الاستنسال والتوأمة نحو عتبة جديدة غير مسبوقة من النواحي العلمية والأخلاقية.

إن نجاح تجارب الاستنسال بالانشطار الجنيني جعل العالم في مواجهة نمط جديد من التقنيات التناسلية المستقبلية والتي تم تطبيقها بنجاح على مخلوق وكائن حي هو الأكثر قرباً للإنسان من أي حيوان آخر، حيث أنه أكثر قرباً من الماشية على سبيل المثال. وتمت عملية الاستنسال والحصول على توائم القرود المتطابقة وراثياً (الشكل 5 - 9) بالانشطار الجنيني لأجنة مؤلفة من ثماني خلايا، وفي الحقيقة فإن التقنية بحد ذاتها لم تكن جديدة، إذ سبق وأن أجريت على الخراف والماشية والخنازير والأرانب، ولكن الجديد كان في تطبيقها على فصيلة حيوانية أكثر قرباً للإنسان، وتمهد تقنية الاستنسال المعروفة بـ (نقل الأنوية) الطريق نحو الإنتاج الجماعي للقرود المتماثلة وراثياً، وتكمن أهمية هذه النقطة بالذات في إمكانية إجراء التجارب والاختبارات على عدد محدود من حيوانات الاختبار المتماثلة وراثياً وضمان أن يكون التأثير هو للعقار المستخدم ولا علاقة له بالاختلافات الوراثية بين حيوان وآخر.



الشكل (5 - 9)* قـردان تم اسـتنسالـهمـا بالانشطار الجنـيني في مـركز أبحـاث أوريغـون وشكل هذا الحدث سابقة خطيرة نحو إمكانية الاستنسال البشري.

ونظراً لما تثيـره هذه التجارب من إيحاء وإغـراءات قوية نحو استـخدامها لاسـتنسال البشر فقد تم مناقشة ألنواحي العلميـة والأخلاقية لهذا الموضوع المهم في الاجتماع الدولي لاستنسال (كلونة) اللبائن الذي عـقد في شهر حزيران 1997 في أرلنغتون (Arlington) في ولاية فرجينيا، وحضره أكثر من 100 عالم من المهتمين بهذا الجانب.

5 - 5 استنسال ميكان وموراك من خلايا مستزرعة:

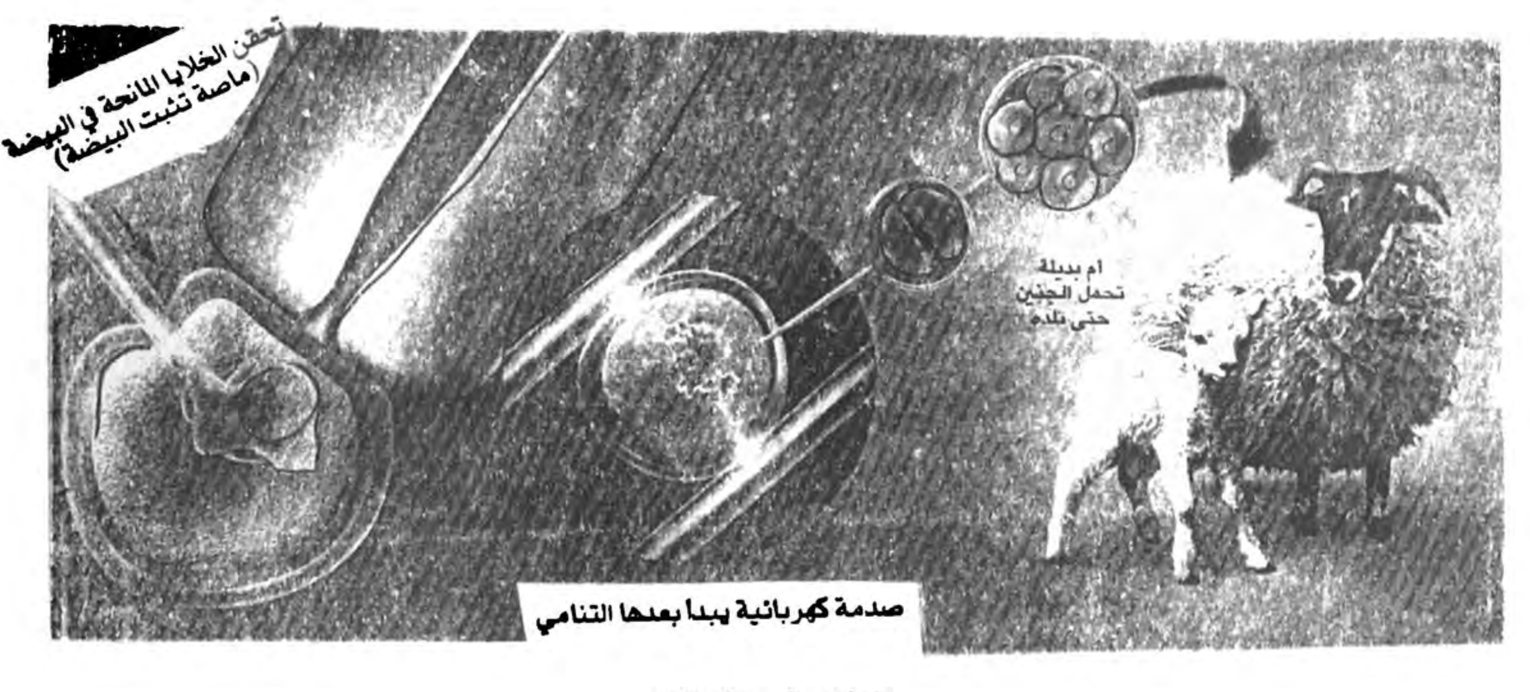
كان استنسال النعجتين «ميكان وموراك» من خلايا جنينية مستزرغة حدثاً بالغ الأهمية، وأثبت لأول مرة إمكانية الحصول على نسل حي (الشكل 5 - 10) من خلايا جنينية مستزرعة تم تضامها مع بويضات منزوعة النواة وباستخدام تقنية متطورة (الشكل 5 - 11 A , B)، ناجحة، وشملت التقنية مجموعة من المراحل شكلت الأساس الذي تم استخدامه في استنسال النعجة «دوللي» بعد ذلك بعامين فقط، وتضمنت الخطوة الأولى أخذ خلايا مفردة من جنين نعجة ملساء الوجه عمره تسعة أيام وتفريق خلاياه وتنمية الخلايا المفردة في مستنبت زرعي، وفي الوقت ذاته يتم أخذ خلية بيضة من نعجة سوداء الوجه وباستخدام ماصة دقيقة تتم إزالة الكروموسومات من خلية البيضة وتصبح خلية البيضة منزوعة النواة، تنقل بعدها الخلايا الجنينية المفردة النامية في المستنبت الزرعي إلى محلول مغذي مخفف، أما المرحلة الثانية فتتضمن تثبيت خلية البيضة منزوعة النواة باستخدام ماصة داعمة وحقن الخلية الجنينية المفردة النامية في المحلول المغذي المخفف باستخدام ماصة مجهرية إلى داخل خلية البويضة وتعريضها لاحقاً إلى صدمة كهربائية لتحفيز تنامي الخلية الجنينية، ينقل بعدها الجنين الناتج (6 - 8 خلايا) إلى أم بديلة (مرضع) سوداء الوجه لإكمال فترة الحمل والحصول على النسل أو الذرية المستنسلة الحية.



الشكل (5 - 10): ميكان وموراك أول نعجتين مستنسلتين من خلايا مستزرعة.



الشكل (5 - 11) (A): التقنية المستخدمة في استنسال النعجتان ميكان وموراك.


تحقن الخلايا المانحة في البيضة
(ماصة تثبت البيضة)
صدمة كهربائية يبدأ بعدها التنامي
ام بديلة
تحمل الجنين
حتى تلدم

الشكل (5 - 11) (B)

الفصل السادس

النقل النووي

6 – النـقـــل النـــووي Nuclear Transfer

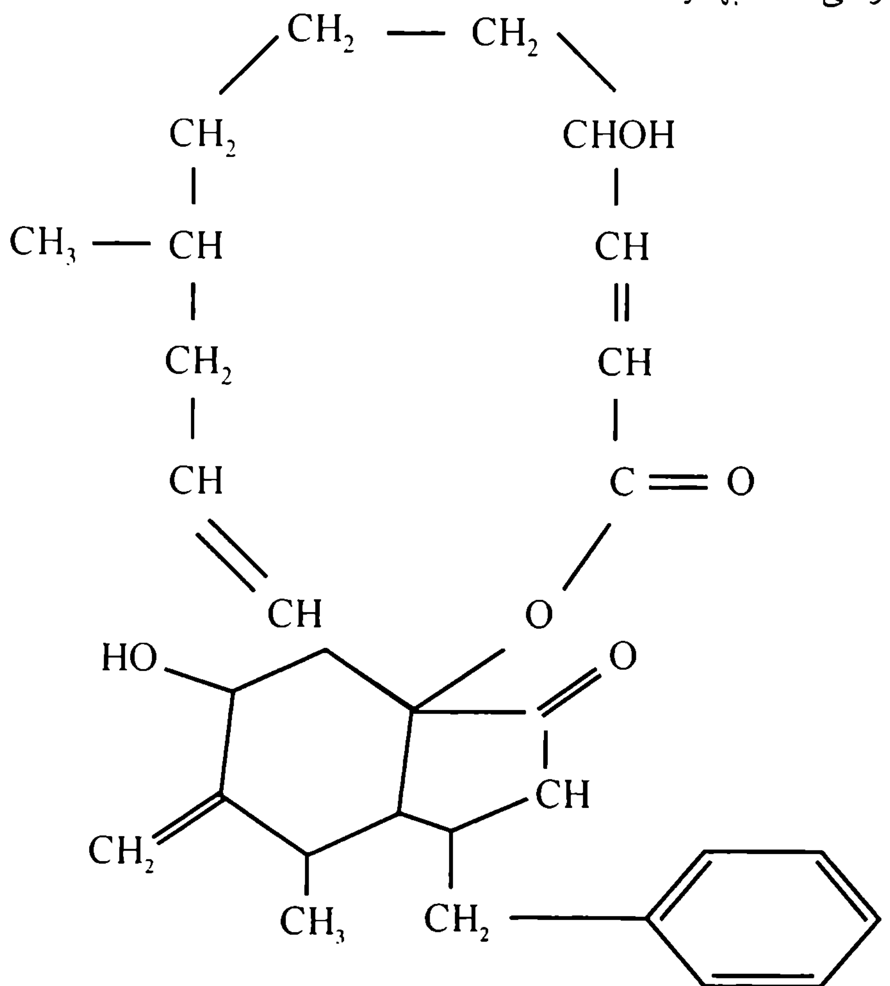
6 - 1 مقدمة عامة

يعـد أسلوب النقل النووي واحداً من أهم أسـاليب هندسـة التكاثر، أجريت مـعظم تجارب النقـل النووي على اللبائن وعلى الفـئران بشكل خـاص، ويعتمـد الأسلوب على شطر أو تنصـيف البـويضات ذات الخـلية المفـردة في وسط يحـوي السـايتوكـالاسين ـ ب Cytochalasin - B (الشكل 6 - 1). والسـايتـوكالاسين عـبـارة عن مـسـتـقلبـات فطرية، أوضح العالم الإنكليزي كارتر (S.B.Carter) في أواسط الستـينيات بامتلاكهـا لعدد من التـأثيرات الـغريبـة على سلوك الخليـة، ومن هذه التـأثيـرات هو قدرتهـا إذا مـا أضيـفت بجرعات معينة عـلى إيقاف الانقسام الخلوي أو إيقافه نهائياً، أمـا إذا أضيفت في جرعات أخرى فإنهـا تجعل سايتوبلازم الخليـة يطرد النواة إلى خارج الخلية، إذ تتحـرك النواة نحو حافة الخلـية مشكلة انتفـاخاً في جدار الغشـاء السايتوبلازمي، بعد دقـائق قليلة من تعرض الخلايا للمادة وتندفع النواة على أثرها إلى خارج الغـشاء، وفي بعض الأحيان تبقى النواة متـصلة بالخليـة التي خرجت منهـا بخيط سـايتوبلازمي رفـيع، ويمكن في الحـقيقـة عكس العمليـة وإعادة إدخال النواة إلى الخليـة من جديد، حالما يتم وضع الخليـة في وسط جديد خال من مادة السايتـوكالاسين، وأهمية هذه المادة العجيـبة لا تقتصر على عملهـا كمشرط كيميائي حسب، بل إنها قادرة على إيقاف الانقسام السايتوبلازمي إيقافاً تاماً دون أن يؤثر ذلك على انقسام النواة، وهذه الميزة (تساعد على تحـقيق التزامن والتواقت) بين البويضات والخلايا الجسمية.

وفي عام 1970 استخدمت مادة السايتـوكالاسين لطرد نوى أنواع مختلفة من خلايا اللبائن (الثدييـات) دون أن تتأثر هذه الأنوية أو السايتوبلازم المحيط بها، وتمكـن الباحثون من إعادة ترتيب الخـلايا المفككة باستخـدام فايروس سنداي (Sendai Virus) وكانت هذه المحاولة إشارة غاية في الوضوح نحو إمكانية استنسال الحيوانات الثدية.

تمتاز الخويطات المجهرية Microfilaments بحساسيتها العالية لهذه المادة السـامة حيث تمزق الترتيب أو النظام المعتـاد لهذه الخويطات، ولا تقتصر تأثيـرات هذه المادة السامة على

الخويطات المجهرية حسب بل تؤثر على وظائف متعددة للخلية فهي تثبط وتؤثر على الحشوة السايتوبلازمية (المطرق) Matrix وعلى الجريان السايتوبلازمي، وعلى حركة الخلية وعلى استقطابها Polarity.



شكل (6 - 1): التركيب الكيميائي لمادة السايتوكالاسين ـ ب Cytochalasin - B وتعني باللغة الإغريقية (مرخي الخلية).

استخدم أسلوب النقل النووي في الحيوانات الثديية كأداة قيمة في الدراسات الجنينية وكأسلوب لمضاعفة (أجنة النخبة أو الصفوة) Elite Embryos ، على الرغم من أن الذرية Offspring لم يتم تسجيلها إلا عند استخدام الأجنة المبكرة من متبرعات للأنوية.

6 - 2 تجارب النقل النووي في الخراف:

لم ينجح العلماء في تجارب النقل النووي في الخراف حتى بداية عقد الثمانينيات من القرن العشرين، وأجريت العديد من التجارب المبكرة في معهد (A.R.C) للفسلجة الحيوانية في كامبردج. وفي عام 1981 بين الباحث ويلادسن (S.M.Willadsen) القدرة والإمكانية التطورية للقسيمات الأرومية المعزولة من أجنة خراف ذوات 4 , 8 خلايا ومن بين 202 جنيناً تم نقلها، تمكن الباحث من استرداد 180 أي 89 % منها ومن هؤلاء الأجنة فإن 159 أي 88 % منها تمكنت من مواصلة النمو والتطور بمعدل طبيعي.

وتمكن الباحث نفسه (ويلادسن) في عام 1984 من تطوير أسلوب للنقل النووي إلى أجنة الخراف ويعد هذا الأسلوب الأول من نوعه في الخراف ونظراً لأهمية هذا الأسلوب فسوف نتطرق إليه باسهاب، اعتمد المنهج التقني أو الأسلوب الجديد على جمع البيوض والأجنة من نعاج تعود للسلالة المنتجة (نعاج شيفوت X Cheviot خراف جيل ويلز Welsh Mountain) وفي اليوم (صفر) وقبل بضع ساعات من بداية أو مستهل دورة النزوة المتوقعة استلمت النعاج المتبرعة 500 وحدة دولية من هرمون موجهة القند المشيمائي البشري (hCG) Human Chorionic Gonadotropin داخل الوريد، وتم استعادة البيوض غير المخصبة من النعاج المتبرعة بعد 30 - 33 ساعة من تطبيق الجرعات الهرمونية، جمعت الأجنة ذوات الـ 8 و 16 خلية في اليوم الثالث والرابع على التوالي من النعاج المتبرعة الملقحة بالسائل المنوي لخراف السفولك Suffolk.

وأجريت عمليات الخزن والتطويع والنقل في وسط دارىء الفوسفات الملحي الإغنائي (PBS) وفي درجة حرارة الغرفة (20°م)، ثم استخدمت إبرة زجاجية دقيقة في عمل شق طولي واسع في الغشاء الواقي للبيضة (ZP) وفوق الجسم القطبي للبيضة غير المخصبة، ثم نقلت البيوض إلى محلول الدارىء الملحي (PBS) الحاوي على 5 مايكروغرام/ مليلتر من السايتوكالاسين B (شركة سمكا)، وبعد مرور ساعة تم سحب الجسم القطبي وسايتوبلازم البيضة المجاور له (باستخدام ماصة دقيقة بقطر 30 مايكروميتر) وإزالته، وبهذه الطريقة يمكن لأغلب البويضات (90 % أو أكثر) أن تنقسم

إلى خليتين بغشاء خلوي سليم وكل منها يحتوي على نصف سايتوبلازم (هيولي) البيضة Ooplasm تقريباً.

وأظهرت الدراسات الأولية، التي تم بها صبغ أنصاف خلايا البيضة بصبغة الأكردين البرتقالي Acridine Orang وفحصها بالمجهر المتألق 75 % من أنصاف البيوض والتي أزيلت مع الجسم القطبي تحوي كروموسومات الطور الاستوائي الثاني لخلية البيضة Oocyte Metaphase II Chromosomes «تسمى المرحلة الأولى من هذا الطور بالطور ما قبل الاستوائي (Metaphase) وهي تتبع مباشرة اختفاء غشاء النواة وفيه تتركز الكروموسومات في مركز الخلية ويكتمل تكون المغزل» أو تسمى هذه الأنصاف بالأنصاف المنواة Nucleated Halfs في حين لا تحوي الأنصاف الأخرى لخلايا البيضة على تراكيب نووية وتسمى الأنصاف المفصوعة (مزالة النواة) Enucleated egg halfs.

تم التطويع المجهري بإيلاج القسيمات الأرومية المفردة المعزولة من الأجنة ذوات الـ 8 و 16 خلية في الغطاء الواقي للبيضة (ZP) للأنصاف المنواة والمفصوعة النواة على حد سواء، وباستخدام جهاز المطواع المجهري Micromanipulator واثنان من المحاقن المجهرية De Fonbrune Microsyringes، ولغرض تحفيز اندماج الخلايا تم استخدام أسلوب الاندماج المحفز بفايروس السنداي Sendai Virus.

6 - 2 - 1 اسلوب الاندماج المحفز بفايروس السنداي:

يعتمد هذا الأسلوب على وضع القسيمات الأرومية في عالق من فايروسات السنداي غير الفعالة «بحدود 1000 وحدة تلازن دموي Haemoagglutination Unit لكل مليلتر من دارىء الفوسفات الملحي PBS والسايتوكالاسين ولمدة دقيقتين ومباشرة قبل إضافتها إلى أجزاء البيوض».

ويمكن تحفيز الاندماج باستخدام وسيلة غاية في الروعة والكفاءة وتعرف الطريقة بالاندماج الكهربائي (Electrofusion) (راجع الفقرة 3 - 2 - الفصل الثالث).

6 - 2 - 2 الاندماج الكهربائي:

يتم إجراء عملية التحفيز أو الاندماج الكهربائي بوضع الأغطية الواقية للبيضة الحاوية على القسيم الأرومي وأنصاف البيوض في محلول يتكون من: 0.3 مولار كبريتات المغنيسيوم، و0.05 ملي مولار كلوريد الكالسيوم في الماء ولمدة 15 - 30 دقيقة، نقلت الأنصاف بعدها في نفس الوسط إلى حجرة الاندماج (الحاوية) لجهاز الاندماج الكهربائي، ويتم تعريضها لظروف الاندماج التالية:

$600\ KH_2$ ، 6 فولت لمدة (5 - 10 ثواني) يعقبها ثلاثة نبضات اندماج 15 فولت (d.c) لمدة 0.1 مايكروثانية لكل منها وعلى فاصلة 0.1 ثانية بين الواحدة والأخرى، ثم تركت لمدة دقيقة واحدة بفولتية مقدارها (صفر) ثم تمت حضانة جميع الأجنة بدرجة حرارة 37 م° في محلول الـ (PBS) الحاوي على السايتوكالايسين B، ثم وضعت الأجنة المدمجة في محلول (PBS) في درجة حرارة الغرفة وتم طمرها بالهلام ونقلت إلى أقنية البيض اللاحمة لنعاج في طور النزو وبعد أربعة أيام ونصف إلى خمسة أيام ونصف تم استردادها من النعاج وفحصها واختبارها. وتم نقل تلك التي تطورت إلى أكياس أريمية طبيعية التنظيم إلى نعاج مستلمات في اليوم السادس أو السابع من دورة النزو. أما بقية الأجنة فيمكن فحصها بالمجهر متباين الطور Phase - Contrast بعد تثبيت العينة في حامض الخليك/ إيثانول ونسبة 3:1 على التوالي وضعها بصبغة اللاكومايد Lacomoid في 40% من حامض الخليك.

إن النجاح اللاحق لعملية الاندماج سواء كان محفزاً بالفايروس أو كهربائياً يعتمد على إعادة برمجة الموروث، حيث من الأسهل إعادة البرمجة والموروث مفتوح وخاضع لعملية التضاعف، إذ أن سمة النتائج تتمثل في الاختلافات الوظيفية بين الموروث الذكري والموروث الأنثوي، والحاجة إلى كلا النوعين للتطور الناجح وهذا يمكن أن يعقد عملية إعادة برمجة الموروث بعد إتمام عملية النقل النووي.

تستعيد الخلايا المستخدمة كمتبرعات للنواة ما يكفي من الوسم الوظيفي لدعم التطور اللاحق، وهذا الاستنتاج تمخض عن كروموسوم X الأبوي لخلايا الفأر الجذعية

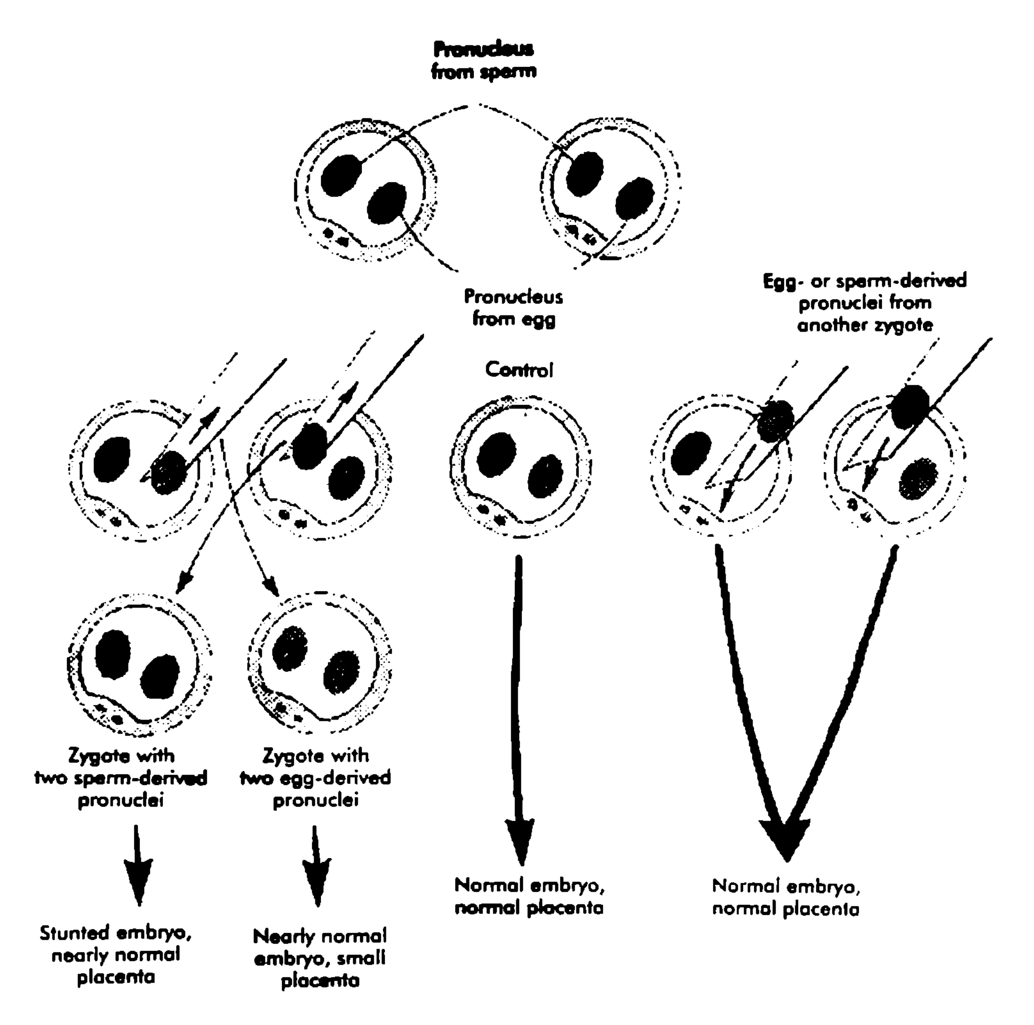
الجنينية والذي يحتفظ بالبصمة أو الوسمة الضرورية لتأكيد التثبيط التفضيلي في الأغشية الجنينية الخارجية وقد يتسبب الفقدان الجزئي للبصمة أو الوسم في الخلايا الجنينية في الحصول على معدل واطىء لتطور الأجنة المطوعة وراثياً.

يعود اكتشاف عملية دمج الجينات Tagged Genes في الفئران إلى العام 1984 ولفت هذا الاكتشاف انتباه علماء الوراثة بحدود العام 1990 ومنذ ذلك الحين وجد الباحثون 15 من الجينات المدموغة Hallmark Genes في الفئران مع مايناظرها عند البشر.

توجد الجينات بصورة مزدوجة حيث يأتي أحد الجينين من الأب والآخر من الأم وكلاهما يكون نشطاً ولكن الجينات المدموغة تكون مختلفة تبعاً لكونها موروثة من الأم أو الأب فهي تحمل علامة بايوكيميائية تكشف عن مصدرها (الأبوي أو امومي) وبشكل ما يكون خاملاً عند مروره إما عبر البويضة أو عبر الحيوان المنوي.

إن طبيعة هذا الصمت الجيني غير معروفة وفي هذه العملية يتم تسكين الدنا (DNA) وذلك بتغطيته بمجاميع المثيل ويعتقد العلماء أن هذه المجاميع قد لا تكون الدمغة الرئيسية ولكن الدنا يعاني من تغيير أو تحول في بناءه وتركيبه مما يؤدي إلى حمل كل كروموسوم لعلامة معينة تشير إلى أنه آت من الأب أو الأم. وإن بعض الجينات المدموغة تنشط إذ كانت قادمة من قبل الأم. ونفس الجين يقف صامتاً إن كان موروثاً من الحيوان المنوي، وليس من البويضة وهناك جينات أخرى تعمل بصورة عكسية، أي أنها تنشط للعمل إن كانت موروثة من قبل الأب، ولا يقتصر الأمر على الكروموسومات الجنسية فقط.

وفي مرحلة معينة من دورة حياة كل كائن ثديي يتخلص الـ (DNA) من دمغاته الوراثية، مفسحاً المجال لجينات مدموغة جديدة. وبينت تجارب غرس الأنوية الأولية كيفية حدوث الوسم أو الدمغ الأبوي (الشكل 6 - 2) .



Parental imprinting by the use of pronuclear transplants.

الشكل (6 - 2) : الوسم أو الدمغ الأبوي باستخدام غرسات النوى الأولية.

وفي عام 1984 ، نجح الباحث (قاسم سوراني) مع اثنين من زملائه في جامعة كامبردج والذين عملوا في الكشف عن تطور الدماغ وسلوك الإنسان البدائي ونجحوا في إنتاج أنواع معينة من أجنة الفئران التي تحمل جينات الأم أو جينات الأب وكانت فكرة التجارب تهدف لاكتشاف سبب عدم قدرة الثدييات على التوالد العذري أو البكري أي من خلال بويضة غير ملقحة، كما يحدث عند بعض الحشرات والنحل، فإذا أخصب البيض يعطي إناثاً، وإذا لم يخصب يعطي ذكوراً، وقد انتهت تجارب الباحثين إلى

اكتشافهم وجود تلك الجينات المعينة. ومن أجل إنتاج أجنة تحمل جينات الأب فقط، نقلوا الدنا DNA من حيوانين منويين نحو بيضة فرغت من محتواها الوراثي. ومن أجل إنتاج جنين يحملان صفات أمه الوراثية فقط، قاموا بجمع الكروموسومات (المحتوى الوراثي) لبويضتين غير مخصبتين، وكان من المفترض أن تنمو الأجنة بشكل طبيعي لأنها تحمل العدد الكامل من الكروموسومات (أو نفس العدد من الجينات) 2n ولكن عند نقل الأجنة إلى رحم الفأرة، ماتت الأجنة التي كانت تحمل صفات وراثية من الأب فقط وكذلك الأجنة التي تحمل صفات وراثية من الأم فقط مما يعني أنه في كلتا الحالتين كانت هناك جينات حيوية لبقاء وتطور الأجنة لم يتم نقلها من الأم أو الأب على حد سواء إلى الأجنة.

إن الحقيقة المهمة التي تم اكتشافها من قبل الباحثين والمتعلقة بقدرة أجنة الفئران على إكمال مدة الحمل داخل أرحام فئران بديلة لأمهاتها طالما أن ما لا يقل عن نصف خلاياها كانت خلايا جنينية طبيعية (أي تملك جينات مشتركة من الأم والأب) أو بمعنى آخر هو عملية الجمع ين الأجنة الحاصلة على جينات من الأب أو الأم مع أجنة طبيعية، مما يؤدي إلى تكوين مزيج جنيني عرف باسم «الوهم» (illusion) ورغم أن الحجم الفعلي للجنين الناتج لم يكن هاماً لدى الباحثين، فإن الشيء الأهم لديهما كان في مراقبة ما حدث لذلك «الجنين الوهم» وللخلايا المأخوذة سواء من الأم أو الأب، وهي تنمو حتى تصبح جنيناً كاملاً. وكانت النتيجة محيرة حيث على الرغم من أن الأجنة أكملت فترة الحمل (ثلاثة أسابيع عند الفئران) الخاصة بها ولكنها لم تكن متشابهة فالأجنة التي زودت بجرعة مضاعفة من الجينات الأنثوية الأصل (من الأم) نمت لتغدو فئراناً برؤوس كبيرة و «أدمغة» مركبة على أجساد صغيرة، وفي المقابل، نمت الأجنة ذات الجرعات الإضافية من الجينات الأبوية الأصل (من الأب) حتى أصبحت ذات أجساد كبيرة ورؤوس صغيرة. ورغم أن الفئران الناتجة كانت غير طبيعية ولم تعش طويلاً، فإنه تم الاستنتاج بأن الجينات الموروثة من الأم تعمل عند تنشيطها على تكوين أدمغة أكبر وبأن الجينات الموروثة من الأب تعمل عند تنشيطها على تكوين أجسام أكبر.

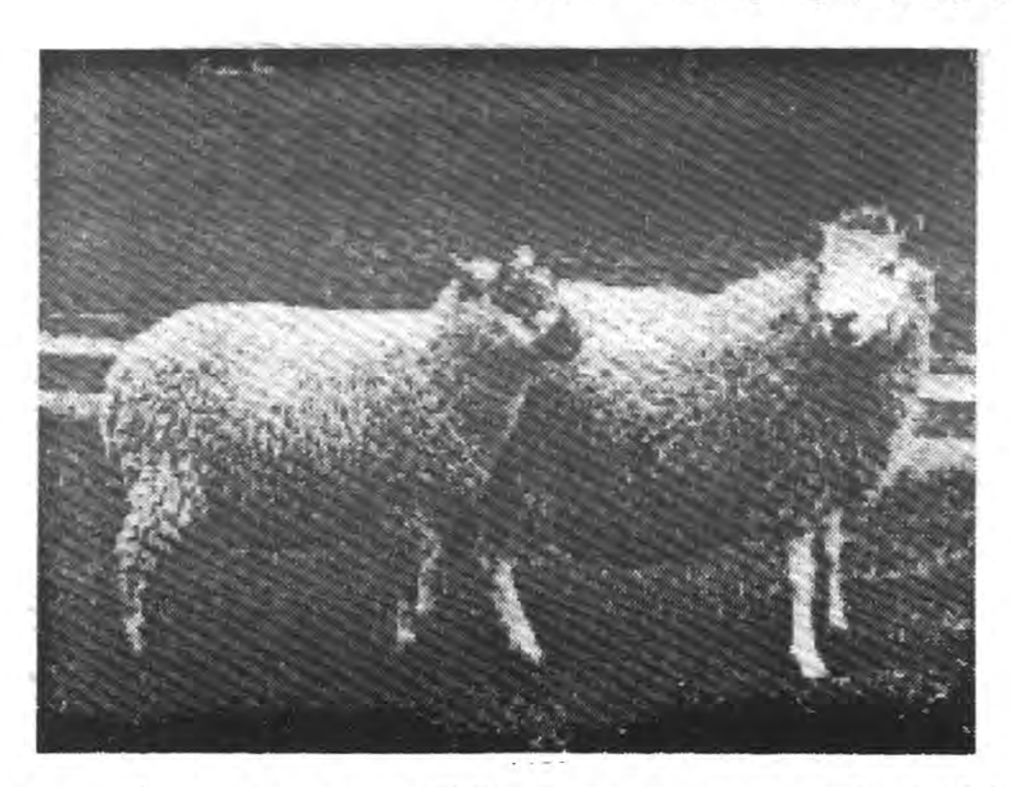
وبذلك استطاع الباحثين إثبات إن الجينات المدموغة التي تتحرك فقط في حالة قدومها من الأم لازمة للجنين في مراحل نموه الأولى، بينما تكون الجينات الموروثة من الأب دورها الفاعل في إتمام عملية النمو الطبيعي للأنسجة التي تشكل المشيمة وإذا كانت هذه الجينات المدموغة تلعب أدواراً رئيسية مختلفة في الأيام الأولى من حياة الجنين فإنها ربما تلعب دوراً هاماً في مرحلة متقدمة من نمو الجنين ونمو الدماغ.

تتصرف الأجنة المعاد تكوينها وكأنها بيوض حاوية على النوى الأولية عوضاً عن تصرفها كقسيمة أرومية مفردة من أجنة ذوات 8 أو 16 خلية. واحتمالية التطور اللاحق هي أكبر وأعظم في الكيسيات الأريمية المنتجة في تجارب الاندماج الكهربائي والاندماج المحفز بفايروس سنداي منها في الشكل الحويصلي المتطور من القسيمة الأريمية المفردة من الأجنة ذات الثماني خلايا والتي يمكن أن تتطور إلى حملان بنسبة أقل من 10 % وإن ثلاثاً من أربع كيسات أريمية باستخدام هذه التجارب (الاندماج) نقلت إلى نعاج متسلمة استطاعت البقاء إلى اكتمال فترة الحمل في موسم التكاثر (1983 - 1984) وإن جميع هذه الثلاث كيسات أريمية أنتجت من أجنة معاد تشكيلها (Reconstituted Embryos) وكانت جميع الحملان الثلاثة التي ولدت بعد انتهاء فترة الحمل تعود إلى سلالة (Suffolk cross bred) (الشكل 6 - 3) وكان اثنان منها -ٍ،ئم متماثلة. وبذلك تم الحصول على عدد من حالات الحمل التي تحققت بعد نقل كيسات أريمية أنتجت بارتباط كيسات أرومية (blas tomeres) مفردة من أجنة ذات 16 خلية مع أنصاف بيوض منزوعة النواة (Enucleated egg halves) فإن ثلاثة نعاج كل منها استلمت كيستان أريمية من مجموعة تحوي ستة أقسام من ذات الجنين ذو الـ 16 خلية قتلت في اليوم الستين (60) وكل من الثلاثة نعاج المستلمة وجد أنها تحمل واحداً من الأجنة الطبيعية.

وأثبتت تجارب «ويلادسن» بأن أجنة كاملة الحيوية يمكن الحصول عليها بارتباط نواة من قسيمة أرومية مكونة من 8 خلايا مع تقريباً نصف السايتوبلازم لخلية البيضة غير المخصبة والأكثر من ذلك فإن النتائج تشير بقوة إلى أنه حتى في حالة الأجنة ذوات الـ 16 خلية فإن نواة القسيم الأرومي تبقى وافرة الجهد أو الفعالية (totipotent) وقد تسمى

بشاملة الوسع أي تملك القدرة على توجيه تمايز الخلايا إلى الأنواع المختلفة المشكلة للكائن الحي الناضج.

إن الهدف الواضح لهذه التجارب هو لتوصيف الظروف المثلى للتجارب اللاحقة المتعلقة بزرع الأنوية والاستنساخ واسع النطاق (Large - Scale Cloning) للحيوانات الاقتصادية الداجنة (Domestic Animal) وأخيراً فإنه بالإمكان الحصول على كيس أريمي (بلاستوسيت) من قسيم أرومي (بلاستومير) ناتج عن انشطار أجنة معاد تشكيلها والذي يعتبر بدوره واهب النواة (nucleus donor).



الشكل (6 - 3) : خراف مهجنة نوع سفولك (Suffolk) انتجت بدمج قسيم أرومي مفرد من جنين ذو ثمان خلايا نوع (سفولك) مع نصف خلية بيضة غير ملقحة منزوعة النواة نوع (ويلش ـ شيفوت) والأجنة ذوات الثمان خلايا التي استخدمت كمتبرعات للأنوية كانت محفوظة بالتجميد العميق لمدة تزيد عن أربع سنوات.

6 - 2 - 3 خطوط الخلايا الجنينية :

تعود أول إشارة إلى إنتاج ذرية حية لحيوانات لبونة باستخدام تقنية النقل النووي من خط من الخلايا الجنينية إلى العالم (كامبل) والذي نشر نتائج أبحاثه في مجلة الطبيعة في شهر آذار من عام 1996، إذ نجح كامبل في تنمية خط من الخلايا الجنينية زرعت لـ 6 - 13 نقلة (Passage) وتم تحفيزها للدخول في حالة الهمود (السكون) Quiescence باستخدام أسلوب التجويع بالمصل (Serum Starvation) وذلك قبل نقل نوى هذه الخلايا إلى خلايا البيوض مزالة الأنوية ومن الضروري التأكيد على أن تحفيز الخلايا المتبرعة للدخول في حالة الهمود والسكون يمكن أن يعمل على تحوير تركيب الكروماتين (الصبغين) للخلية الواهبة مما يسمح بإعادة البرمجة النووية وإلى مراحل التطور اللاحق ويسمح هذا المنهج التقني للباحث بإمكانية تحليل وتحوير وظيفة المورثات في حيوانات الماشية. يعتمد الأسلوب على عزل الخلايا بالتشريح المجهري Microdissection وازدراع Explantation القرص الجنيني Embryonic disc (ED) في اليوم التاسع في الحي، حيث تم تأسيس الخط الخلوي من النقلات المبكرة للخلايا الجذعية الجنينية (ES)، وتتخذ الخلايا مظهر الخلايا الظهارية Epithelial وذات مظهر مسطح Flattened والتي تتم إدامتها في أوساط زرعية إضافية ولـ (25 نقلة إضافية على الأقل) وأطلق على هذا الخط الخلوي من الخلايا الظهارية المشتقة من الجنين بالمصطلح TNT وتعني Totipotent Nuclear Transfer .

هذا ويعتمد تطور الأجنة المعاد تكوينها (Reconstructed) باستخدام تقنية النقل النووي على التداخلات بين النواة الواهبة والعوامل الأنزيمية في سايتوبلازم الخلية، ومن أهم هذه العوامل هو فعالية أنزيم الكايناز السايتوبلازمي Cytoplasmic Kinase، العامل المحفز للنضوج Maturation/mitosis/meiosis Promoting Factor (MPF) ، ،من الضروري الإشارة إلى إمكانية تعرض الأجنة المعاد تكوينها أو تشكيلها إلى الضرر أو التلف الكروموسومي وحصول اختلال في الصيغة الصبغية Aneuploidy، إذ تخضع النواة المنقولة بوجود مستوى عالي من (MPF) إلى انحلال الغشاء النووي وتكثيف الكروموسومات، ويمكن الحد من تأثير الضرر الحاصل بنقل الأنوية بعد اختفاء واضمحلال فعالية العامل المحفز للنضوج والانشطار الخلوي (MPF) وذلك باستخدام

أسلوب التنشيط المسبق لخلايا البيضة مفصوعة النواة المقيدة في الطور الاستوائي الثاني، أما الوسيلة الأخرى لتلافي الضرر أو التلف الناتج عن فعالية الـ (MPF) فتتمثل في نقل الأنوية الضعفانية (ثنائية المجموعة الكروموسومية) Diptoidnuclei إلى خلايا البيضة في التالي (الاستوائي)، حيث تسمح جاهزية خلايا TNT لهذا الأسلوب بالاستخدام.

6 - 2 - 3 - 1 الأسلوب المستخدم للحصول على الخطوط الخلوية:

تؤخذ مجموعة من 4 - 6 أقراص جنينية (Ed) والتي يمكن الحصول عليها بالتشريح المجهري للخلايا وتزرع على طبقات مغذية Feeder Layers مكونة من أرومات ليفية Fibroblasts فأرية أو جرذية مثبطة التفتل (الانقسام المايتوزي) في وسط (GIBCO) Dulbeccos Modified Eagles Medium الحاوي على 10 % FCS و 10 % من مصل الوليد Newborn Serum والمضاف إليه العامل المثبط لابيضاض الدم ذو التركيبالوراثي الجديد Recombinant Human Leukaemia Inhibition Factor (LIF) وبعد 5 - 7 أيام من الزرع يتم معاملة الأقراص الممدودة (المنشورة مع التربسين، تمرر بعدها وتنقل إلى أوساط مغذية جديدة، وبذلك يمكن الحصول على خطوط خلوية متماثلة، يتم بعدها عزل وتنقية دنا الموروث (المجين) وإجراء تفاعل التضخيم (التفاعل السَلسَلي لأنزيم بلمرة الدنا)PCR للتوابع المجهرية Microsatellite لغرض التأكد من أن الخلايا تعود إلى مجموعة سكانية ناشئة من خلية واحدة Single cell population أما الباحث كامبل (Campbell) وجماعته فقد استخدم أسلوباً رائعاً في تقنية النقل النووي، إذ أخذ قرصاً جنينياً من الكيسة الأريمية (الشكل 6 - 4) ونميت في مزرعة نسيجية جنينية وعلى طبقة مغذية، والحصول على خطوط دائمية من الخلايا، لقحت هذه الخلايا الجنينية في خلية البيضة المستلمة، بعد إزالة جزء صغير من سايتوبلازم خلية البيضة الذي يحتوي الصفيحة الاستوائية (نبذ الكروموسومات)، حيث تتم عملية النقل النووي باندماج خلية جنينية مفردة تعود لخط الخلايا شاملة الوسع Totipotent ومن ثم تتم عملية زرع وغرس الجنين الناتج في نعجة مستلمة مؤقتاً، يتم بعد ذلك تقييم وتحديد حالتها بعد سبعة أيام، ثم يتم إعادة زرع وغرس الأكياس الأريمية والتويتات Morulas في نعجة أخرى لحين الولادة.

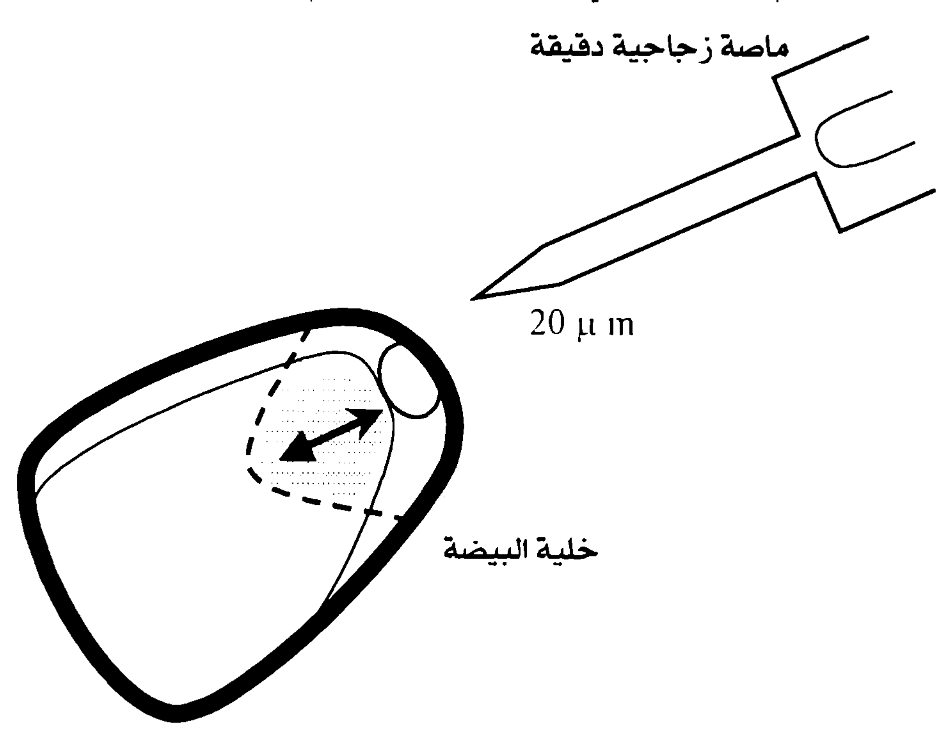
الشكل (6 - 4): تقنية النقل النووي المعتمدة على الخلايا المزروعة من الأقراص الجنينية والمطورة من قبل الباحث كامبل (Campbell).

إن روعة هذه التقنية تتمثل في حقيقة أنه متى ما تم الحصول على خط من الخلايا شاملة الوسع (وافرة الفعالية) وهي خلايا غير متمايزة يمكنها التمايز إلى مختلف أنواع الخلايا المكونة للكائن الحي الكامل، فإنه لن تكون هناك حدود للتغيير الوراثي الذي يمكن أن يستمر في كل الاتجاهات مثل الحصول على سلالات من الخراف المبرمجة والمحورة وراثياً والإنتاج واسع النطاق للحيوانات الاقتصادية.

6-2-4 إعادة بناء وتشكيل الأجنة Embryo Reconstruction :

من أجل إعادة بناء وتشكيل الأجنة، توضع خلايا البيضة الواهبة في وسط حاوي على الكالسيوم الخالي من M_2 (Calcium - Free M_2) الحاوي على 10 % FCS مصل العجل الجنيني و 7.5 مايكروغرام/ مليلتر من السايتوكالاسين B و 5 مايكروغرام/ مليلتر هويشست Hoechst 33342 (سكما) (في 37°م) لمدة 20 دقيقة للشفط

Aspirate ، وباستخدام ماصة زجاجية دقيقة بقطر لا يزيد عن 20 مايكروميتر تتم إزالة كمية صغيرة من السايتوبلازم المتضمن في الغشاء البلازمي مباشرة تحت الجسم القطبي الأول (1 st Polar body) (الشكل 6 - 5) وتم التأكد من فصع وإزالة النواة من خلال تعريض البروتوبلاست النووي Karyoplast إلى الأشعة فوق البنفسجية والتحري عن وجود الصفيحة الاستوائية، وبعد 34 - 36 ساعة من الحقن بالهرمون المحرر للكونادوتروبين Gonadotropin - releasing Hormone (GnRH) ، يتم تنشيط خلايا البيوض منزوعة النوى، حيث يتم زرع هذه الخلايا لمدة 4 - 6 ساعات في وسط TC 199 (الجدول 6 - 1) و 10 % مصل العجل الجنيني FCS، إذ يتم دمج خلية مفردة وباستخدام وسط التنشيط والاندماج المكون من: 0.3 مولار مانيتول و 0.1 ملي مولار كبريتات المغنيسيوم و 0.0005 ملي مولار كلوريد الكالسيوم.



الشكل (6 - 5) : إزالة جزء صغير من السايتوبلازم (المنطقة المضللة) باستخدام ماصة زجاجية دقيقة.

الجدول(6 - 1): مكونات وسط TC 199

MEDIA

TC MEDIUM 199 Code 5477

MORGAN & MORTON MEDIUM 150

Ingredients per liter

L - Arginine	70 mg	Calcium Pantothenate	0.01mg
L - Histidine	20mg	Biotin	0.01mg
L - Lysine	70mg	Folic Acid	0.01mg
L - Tyrosine	40mg	Cholin	0.5mg
DL-Tryptophane	20mg	Inositol	0.05mg
DL- Phenylalanine	50mg	P-Aminobenzoic Acid	0.05mg
L- Cystine	20mg	Vitamin A	0.1mg
DL- Methionine	30mg	Calciferol	0.1mg
DL-Serine	50mg	Menadione	0.01mg
DL- Theronine	60mg	α-Tocopherol Phosphate	0.01mg
DL-Leucine	120mg	Ascorbic Acid	0.05mg
DL-Isoleucine	40mg	Glutathione	0.05mg
Dl- Valine	50mg	Cholesterol	0.2mg
DL - Glutamic Acid	150mg	L-Glutamine	100mg
DL - Aspartic Acid	60mg	Adenosinetriphosphate	1mg
DL - Alanine	50mg	Adenylic Acid	0.2mg
L - Proline	40mg	Ribose	0.5mg
L - Hydroxproline	10mg	Desoxyribose	0.5mg
Glycine	50mg	Bacto - Dextrose	1000mg
L - Cysteine	0.1mg	Tween 80	5mg
Adenine	10mg	Sodium Acetate	50mg
Guanine	0.3mg	Iron (as Ferric Nitrate)	0.1mg
Xanthine	0.3mg	Sodium Chloride	8000mg
Hypoxanthine	0.3mg	potassium Chloride	400mg
Thymine	0.3mg	Calcium Chloride	140mg
Uracil	0.3mg	Magnesium Sulfate	200mg
Thiamine Hydrochloride	0.01mg	Disodium Phosphate	60mg
Riboflavin	0.01mg	Monopotassium Phosphate	60mg
Pyridoxine Hydrochloride	0.025 mg	Sodium Bicarbonat	350 mg
Pyridoxal Hydrochloride	0.025mg	Bacto-Phenol Red	20mg
Niacin	0.025mg	Carbon Dioxide	
Niacinamide	0.025mg		

6 - 2 - 4 - 1 التحفيز الكهربائي (التنشيط والاندماج)

تستخدم نبضة مفردة من التيار المستمر (DC) مقدارها 1.25 كيلوفولت/ سم لمدة 80 مايكروثانية لغرض التنشيط، أما لغرض الاندماج فتستخدم نبضة من التيار المتناوب (AC) مقدارها 3 فولت لمدة 5 ثواني يعقبها ثلاثة نبضات من التياز المستمر مقدار كل منها 1.25 كيلوفولت/ سم لمدة 80 مايكروثانية. تزرع بعدها جميع أزواج (الخلايا الواهبة/ خلايا البيض المستلمة) في وسط TC 199 و 10 % FCS و 7.5 مايكروغرام/ مليلتر سايتوكالاسين B لمدة ساعة واحدة عقب تطبيق نبضات الاندماج، تنقل بعدها إلى نفس الوسط ولكن بدون مادة السايتوكالاسين لحين نقلها إلى النعاج المستلمة.

6 - 2 - 5 إعادة البرمجة الوظيفية ودورة الخلية

6 - 2 - 5 - 1 متطلبات إعادة البرمجة:

يعتمد النقل النووي الفعال أساساً على عملية إعادة البرمجة Reprograming الوظيفية الفعالة الملائمة والكافية للنواة الواهبة. إذ تخزن الجزيئات الحيوية الكبيرة كالرنا المرسال m - RNA والبروتينات في سايتوبلازم خلية البيضة ويدعم هذا الخزين عملية التطور لفترة قصيرة نسبياً (يتم تحديدها من خلال حساب عدد الانقسامات الخلوية)، وكلما كانت هذه الفترة أقصر كلما تطلبت عملية إعادة البرمجة زمناً أقصر، وحيث أن الأجنة تتعرض للمزيد من التغيرات خلال مراحل النمو والتطور، فإن الخلايا من الأجنة الأكبر Older Embryos سوف تتطلب وقتاً أطول لإعادة البرمجة وأرجحية في عدم اكتمال عملية إعادة البرمجة، وقد تم معرفة مجموعة من الحقائق المتعلقة بمتطلبات إعادة البرمجة الكفوءة والتي تشمل:

1 - ضرورة وجود كمية من الرنا المرسال والبروتين في خلية البيضة.

2 - ضرورة التعامل مع خلايا جنينية (خلايا شاملة الوسع، وافرة الفعالية) أو قسائم أرومية حديثة الجمع ومبكرة لغرض زيادة كفاءة عملية إعادة البرمجة.

3 - ضرورة وجود توافق Compatibility بين سايتوبلازم خلية البيضة المستلمة والنواة الواهبة (تتطلب هذه النقطة إجراء دراسات مكثفة لتحديد واستجلاء غموضها).

تشير المعلومات المتاحة حالياً إلى وجود عاملين يجب توفرهما على الأقل لتحقيق عملية نقل نووي ناجحة:

العامل الأول: بينت التجارب أن استخدام الخلية البيضية الناضجة Oocyte (وهي الخلية التي تنقسم انقساماً اختزالياً لتكوين خلية البويضة) هو أفضل من استخدام الزايكوت Zygote (بويضة مخصبة: خلية تتكون من اتحاد خليتين جنسيتين ناضجتين خلال عملية التكاثر الجنسي) وهذه الأفضلية قد تعود إلى ما تتطلبه خلية البيضة من وقت أطول لعملية إعادة البرمجة مقارنة بالزايكوت، أو لسبب ما يتعلق بأفضلية سايتوبلازم البيضة عنه في سايتوبلازم الزايكوت بالنسبة لعملية إعادة البرمجة. ومن هذه العوامل على سبيل المثال لا الحصر العوامل السايتوبلازمية الضرورية لتنشيط الموروث ولإعادة نمذجة التضاعف Remodelling of Replication الكروموسومي والتي ينخفض مستواها أو تركيزها بعد الإخصاب بسبب ارتباطها بالدنا المتضاعف أو بسبب التحلل المعتمد على الوقت Time Dependent Degradation.

ولغرض حسم الجدال الدائر حول تأثير العوامل السايتوبلازمية في تطور ونشوء الأجنة معادة التشكيل والتكوين من خلال تأثيرها في عملية إعادة برمجة التعبير الجيني والذي من المحتمل أن يتعزز بوساطة إطالة أمد أو فترة التعرض لهذه العوامل، ولكل الأسباب المعروضة أعلاه أجرى الباحث «كامبل» وجماعته في العام 1996 تجربة لدراسة وتعيين أهمية هذه التأثيرات من خلال دمج الخلية الواهبة مع خلية البيضة في ظروف مختلفة شملت:

1 - إجراء عملية الاندماج قبل 4 - 8 ساعات من التنشيط (Post - Activation).

2 - إجراء عملية الاندماج والتنشيط في وقت واحد Fusion and Activation.

3 - التنشيط المسبق لخلية البيضة Preactivation.

6 - 2 - 5 - 2 الاسلوب المستخدم في الدراسة (داخل الحي)

يتم جمع خلايا البيوض بعد 28 - 33 ساعة من حقن هرمون (GnRH) المحور للكونادوتروبين ويستخدم محلول داريء الفوسفات PBS الحاوي على 1.0 % FCS والخالي من الكالسيوم والمغنيسيوم في عملية استرداد البيوض وغسلها بالماء الدافق. تنقل بعدها البيوض المستردة إلى وسط M_2 الخالي من الكالسيوم والحاوي على 10 % من FCS وتحفظ بدرجة حرارة 37م° في 5% ثاني أوكسيد الكربون، ويتم نزع (فصع) النواة وإعادة بناء وتشكيل الأجنة، وبعد مرور 50 - 54 ساعة من الحقن بالهرمون (GnRH) تطمر بعدها الأجنة المعاد بناءها في الهلام وتنقل إلى قناة البيض في النعاج المستلمة، وبعد 6 أيام يتم استرداد الأجنة ومتابعة التطور باستخدام المجهر.

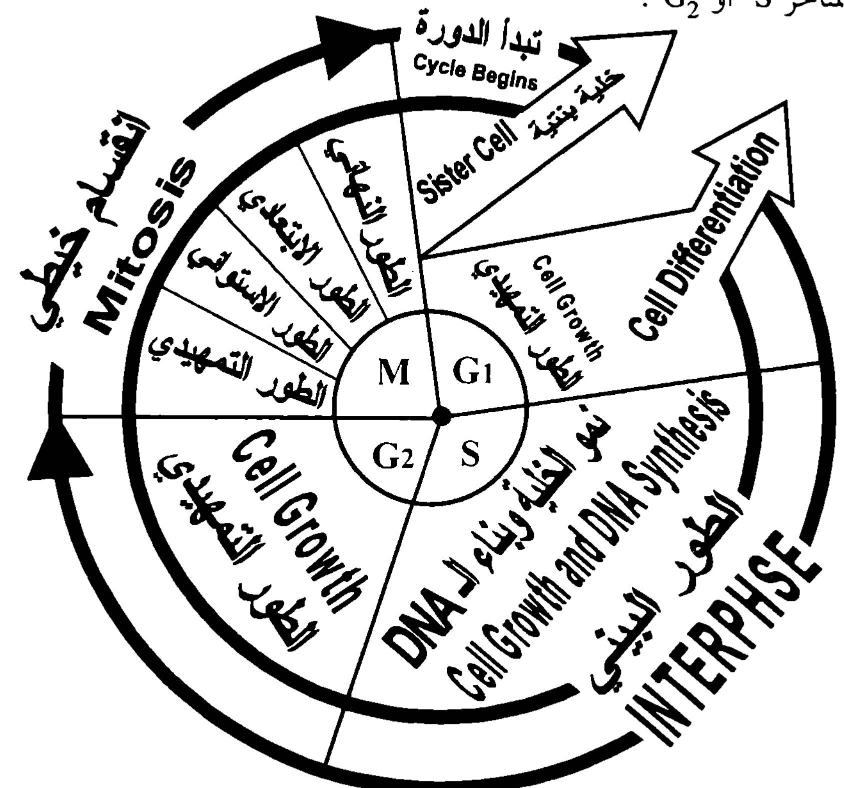
ولغرض حث الخلايا على دخول حالة السكون والهمود quiescent حيث يتم تنمية الخلايا الجنينية (شاملة الوسع) في طبقات مغذية وفي دوارق حاوية على وسط Dulbec cos Modified Eagles Medium (GlBCo) وتزرع لمدة يومين، يغسل بعدها المزروع شبه المتلاقي (المندمج) Semiconfluent في الطور الأسي ثلاث مرات في وسط حاوي على .5 % (FCS) ، وزرعت الخلايا في هذا الوسط ذو التركيز الواطيء من المصل لمدة 5 أيام ويتم إعادة تكوين الأجنة باستخدام السايتوبلاست مسبقة التنشيط أو الفعالية. أما بالنسبة لحالة ما بعد التنشيط Post Activation فإن البروتوكول يتضمن دمج خلية مفردة مع خلية السايتوبلاست بعد نزع النواة مباشرة في وسط حاوي على 0.3 مولاري مانيتول وبدون كالسيوم أو مغنيسيوم (لمنع التنشيط)، يتم غسل وزرع الخلايا المندمجة في وسط M_2 الخالي من الكالسيوم و 10% FCS وتحضن بدرجة حرارة 37 م° وبوجود 5 % CO_2 لمدة 4 - 8 ساعات وقبل التنشيط بنصف ساعة، نقلت المزدوجات (الخلايا المدمجة) إلى وسط M_2 و 10% FCS والحاوي على 5 مايكرومول من النوكودازولNocodazole (من شركة سكما) وعقب التنشيط فإن الزايكوت المعاد تكوينها تحضن في وسط TC 199 بوجود 10% FCS و 5 مايكرومول نوكودازول ولمدة ثلاث ساعات إضافية. أما البروتوكول الأخير وهو التنشيط المسبق Preactivation وفيه تم دمج خلية مفردة مع خلية البيضة منزوعة النواة وبعد مرور 34 - 36 ساعة من تطبيق جرعات الـ GnRH وتستخدم

ـــس النبضـة الكهربائية لتنشـيط خلية السايتـوبلاست إضافة إلى الخليـة الواهبة، هذا ولم
ـلاحظ فروق معنوية في تكرار التطور للنقلات الواطئة العـدد أو العالية للخلية الواهبة أو
ـروق معنوية في نمط الخلايا منزوعة النواة المستلمة.

ومن الجدير بالذكـر أن جميع الأجـنة التي تتطور إلى مرحلة التـويتة/ الكيس الأريمي يجب أن يتم نقلها بأسرع ما يمكن إلى بوق الرحم للنعاج المتـواقتة لتحمل الأجنة إلى فترة ـمخاض الطبـيعي وتتم مراقـبة حملهـا بوساطة جهـاز تخطيط الصدى Ultrasonography وتعد النعاج إيجابية النتيجة في اليوم 35 من الزرع تعتبر نعاجاً حوامل.

أما العامل الآخر الذي يجب توفره لتحقيق عملية نقل نووي ناجحة:

العامـل الثاني: يتمـثل بالطور للنواة الواهبـة، فالأنوية الواهبـة التي تكون في الطور G1 أو GO من دورة الخلية (الشكل 6 - 6) تعطي نتائج أفضل من تلك التي تتواجد في الطور المتأخر S أو G_2.



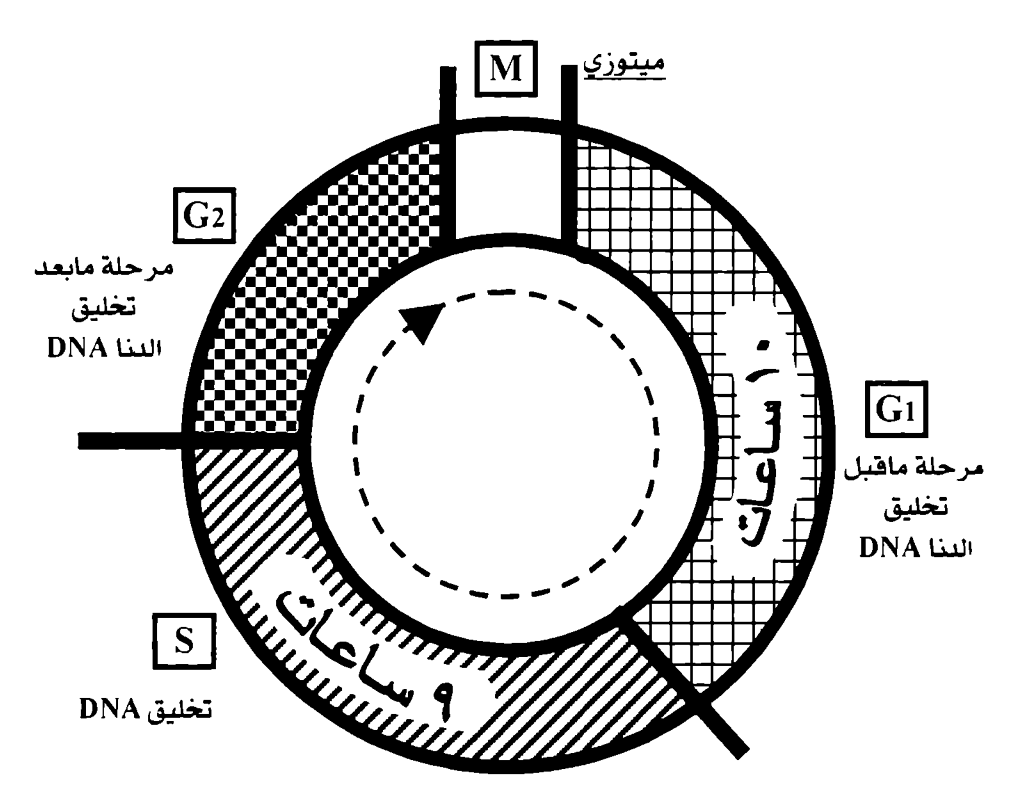
الشكل (6 - 6): يوضح مخطط لدورة نمـو وانقسام النواة لخليـة حقيـقية النواة (نموذجـية)

يختلف الزمن الكلي المطلوب لإتمام دورة ما إلى حد كبير من خلية إلى أخرى وباختلاف الظروف البيئية، ففي أجنة بعض الحيوانات هناك دورة خلية كاملة كل 30 دقيقة وفي اللبائن البالغة تستغرق دورة الخلية عادة حوالي 24 ساعة ولا تقل عن ست ساعات إطلاقاً. إن أكثر الفترات تبايناً من خلية إلى أخرى هي طور الـ G1 (حين تنمو الخلية ولكن دون بناء الدنا») والـ G2 (حين تنمو الخلية وتتهيأ لبدء الانقسام) وفي الخلايا سريعة الانقسام قد لا تكون هاتان الفترتان موجودتين تقريباً. أما في الخلايا بطيئة الانقسام فإنها قد تصل ساعات أو حتى أياماً.

6 - 2 - 5 - 2 دورة الخلية:

يحتاج النمو إلى زيادة في كتلة الخلايا، وتضاعف المادة الوراثية، والانقسام يضمن أن كل خلية بنوية يصل لها مجموعة متساوية من المادة الوراثية ليؤكد المحافظة على خط الخلية. وهذه الخطوات تحدث في نظام مرتب خلال دورة حياة الخلية (الشكل 6 - 7)، وفي البداية فإن الخلية الثنائية المجموعة الكروموسومية (2n) تمر بفترة من النمو وزيادة في الكتلة. وهذه الفترة تعرف بـ G1.

وفي الخلايا التي تتطلب دورة حياتها الكاملة 24 ساعة، فإن المرحلة G1 تحتاج إلى العشر ساعات الأولى. وهذه الفترة تكون مخصصة لنمو الخلية والتجهيز الكيمياوي لبناء الحامض النووي الدنا DNA. وعند وقت معين يبدأ تضاعف المادة الوراثية. وخلال هذا الطو البنائي (S) الذي يستمر 9 ساعات، يتم تخليق الدنا ومضاعفة كل الكروموسومات. هذه التراكيب المتضاعفة تعرف باسم أزواج الكروماتيدات الشقيقة وتحتوي كل منها على نسختين متطابقتين من الكروموسوم بعد اكتمال التضاعف الكروموسومي. وتدخل الخلية في مرحلة النمو الثانية والتي تسمى G_2. وهذه المرحلة التي تلي بناء DNA تحتاج أربع ساعات وتستمر حتى بداية الانقسام الميتوزي (M) والذي يحتاج إلى ساعة واحدة. وخلال الانقسام الميتوزي تنفصل أزواج الكروماتيدات الشقيقة، وتذهب كل واحدة إلى خلية من الخليتين البنويتين.

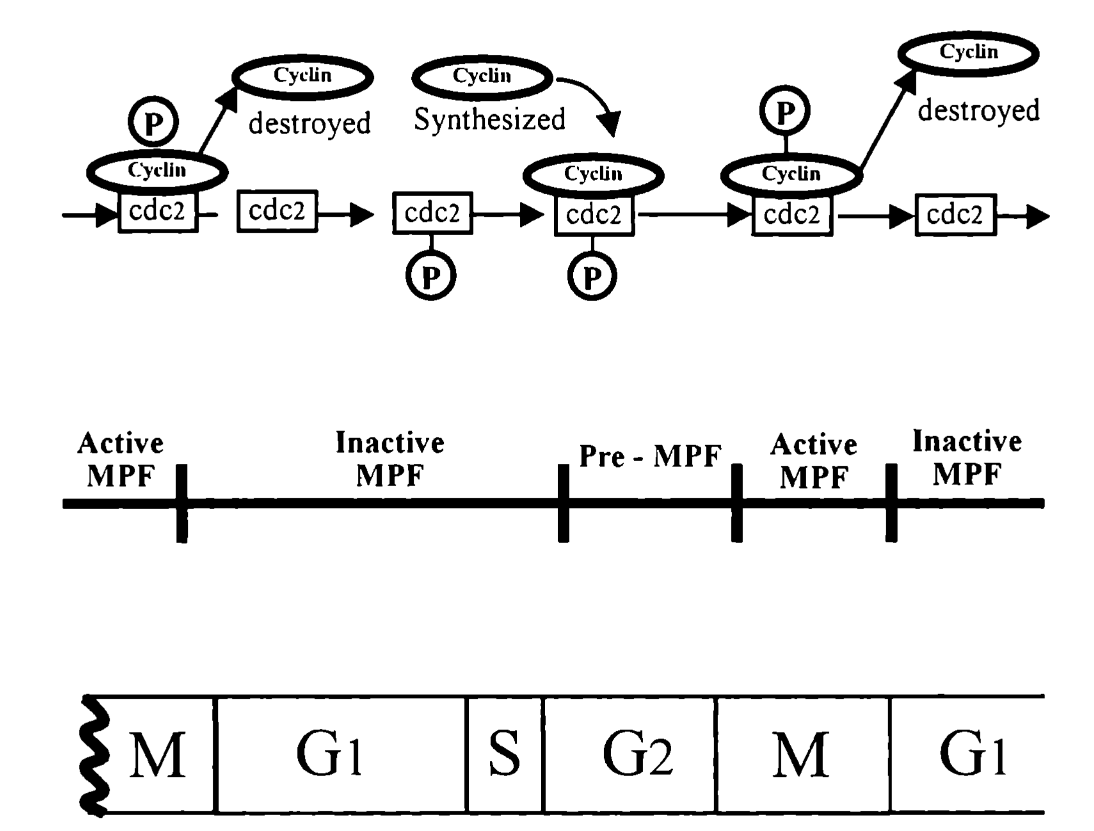


الشكل (6 - 7): رسم تخطيطي يوضح مراحل دورة خلية نموذجية من خلايا الثدييات بعد تنميتها في مزرعة أنسجة لفترة جيل مدتها (24) ساعة.

إن السمة الرئيسية لفترة التشطر (Cleavage Period) هو الموجات المتعاقبة من الانقسام الفتيلي (الخيطي) (Mitosis) التي تجري في الجنين وكل انقسام تفتلي (غير مباشر) يكون تحت السيطرة الكاملة لبروتينات والتي تحافظ على تركيب ووظائف الخلايا لبليون من السنوات أو أكثر ومثل هذا التفسير يستند إلى وجود هذه البروتينات في الكائنات الحية المختلفة. والدراسات الأولى على بيوض الضفادع اقترحت وجود العامل المحفز للنضوج Maturation - Promoting Factor (MPF) والذي يحفز الانتصاف (الانقسام الاختزالي) Meiosisفي خلية البيضة المبكرة. إن الـ MPF يعمل على تنظيم الانقسام الفتيلي والأنتصاف (الانقسام الاختزالي) Mitosis and Meiosis . وأظهرت دراسات أخرى أن الـ MPF الفعال هو عبارة عن معقد مكون من بروتينين، يدعى الأول (cdc 2) أو (دورة انقسام الخلية) (cell division cycle) ، والثاني يدعى cyclin والذي يقود الخلية خلال دورتها التفتلية (الخيطية أو المايتوزية).

إن الدورة التفتلية في أي خلية تنقسم إلى مراحل أو أطوار وبالأساس هناك حالتان للخلية .حالةكونها في عملية الانشطار الخيطي وحالة كونها ليست في هذه العملية والأخيرة تسمى الطور البيني (Interphase) وهي المرحلة بين نهاية انقسام وبداية الانقسام التالي. ولقد كان ينظر إلى الطور البيني في السابق بأنه مرحلة راحة أو استقرار (Resting Stage) ولكن في الوقت الحاضر يعتبر مرحلة نشاط خلوي فعال ومكثف وخاصة على مستوى الفعاليات الأيضية والطور البيني (غالباً ما يدعى بالطور G1) أو فترة النمو الأولى وهي الفترة التي تمارس الخلية فيها فعاليتها الاعتيادية في تكون الحامض النووي الرايبوزي(RNA) وتكوين البروتين ثم تدخل الخلية في طور التركيب S - Phase ويشهد هذا الطور تكوين جزيئات جديدة للدنا DNA أي أن الدنا الأصلي يتضاعف. ويعقب تخليق وتضاعف الدنا الطور G2 أو فترة النمو الثانية (gap2) وهي فترة نمو تعقب تضاعف الدنا وتنسيق البدء في عملية الانقسام أو الانشطار الخيطي (الفتيلي) الفعلية (الطور M - Phase (M . وتنطبق المراحل المذكورة للطور البيني على الخلايا التي هي في حالة انقسام مستمر أي أنه لا تلبث أن تتم عملية أنشطار حتى تبدأ بالتحضير لانشطار تال. ولكن هناك أنواع من الخلايا (في الكائن البالغ) تبقى لفترات طويلة (أسابيع أو أشهر أو حتى سنين طويلة) متحدة فلا تنقسم أو قد تنقسم في فترات متباعدة ففي مثل هذه الحالة تبقى الخلية في الطور البيني ولا تعد نفسها للانشطار أي أنها لا تمر في كل الأدوار المذكورة وقد أطلق البعض على هذه الفترة بـ (GO). يتواجد البروتين cdc2 خلال كامل دورة الانقسام التفتلي (الانشطار الخيطي) أما البروتين الآخر السايكلين (Cyclin) فيتم تخليقه وتراكمه خلال الطور البيني ويرتبط الأخير مع البروتين cdc2 ليكون مركب (Pre - MPF) أو معقد العامل المحفز السابق للنضوج (Prematura tion - Promoting Factor) قبل دخول الخلية للطور M أو بدء الانشطار الخيطي. إن التحوير الأنزيمي يحول هذا المعقد إلى الشكل الفعال من الـ MPF (الشكل 6 - 8) الذي يعمل على بدء عملية الانشطار الخيطي من خلال الفعالية النوعية للـ MPF يبدأ تحلل وتحطم الغلاف النووي وتحفيز تجمع خيوط المغزل ويتضمن العديد من فعاليات الـ MPF فسفرة البروتينات فتحلل الغلاف النووي على سبيل المثال يعود إلي فسفرة الصفيحات النووية (Nuclear lamins) أو بروتينات الغلاف فالفسفرة تسبب تفكك أو انفصال الصفائح مما يؤدي إلى تفسخ (disintegration) الغلاف النووي والـMPF الفعال يعمل أيضاً على تنشيط الأنزيمات المسؤولة عن التكسر أو التحلل المفاجىء للسايكلين cyclin. وعندما تقل مستويات السايكلين عن عتبة معينة (Certain threshold) فإن بروتين الـ

cdc2 في معقد الـ MPF يفقد فعاليته وبالتالي تنتهي دورة الانشطار الخيطي وإن فقدان فعالية الـ MPF يتيح للأنزيمات الفوسفاتيز الخلوية من إزالةمجاميع الفوسفات والتي تمت إضافتها إلى البروتين تحت تأثير الـ MPF . وأحد التأثيرات لذلك سيكون إعادة تكوين الغشاء النووي عندما تبدأ عملية نزع مجاميع الفوسفات من الصفائح النووية وأنزيمات الفوسفاتيز سوف تثبط الأنزيمات التي تكسر السايكلين متيحة بذلك إعادة تجميع وتراكم السايكلين في الخلية خلال الطور البيني وهذا ينظم المراحل من أجل إعادة تكرر الدورة التفتلية (الانشطار الخيطي).



الشكل (6 - 8) : يبين دورة الخلية وعوامل السيطرة عليها.

MPF = Maturation - Promoting Factor

الفصل السابع

الطريق نحو دوللي

7 الطـريـق نحـو دوللـي The Road To Dolly

7 - 1 استنسال دوللي خطوة للبداية أم بداية للنهاية

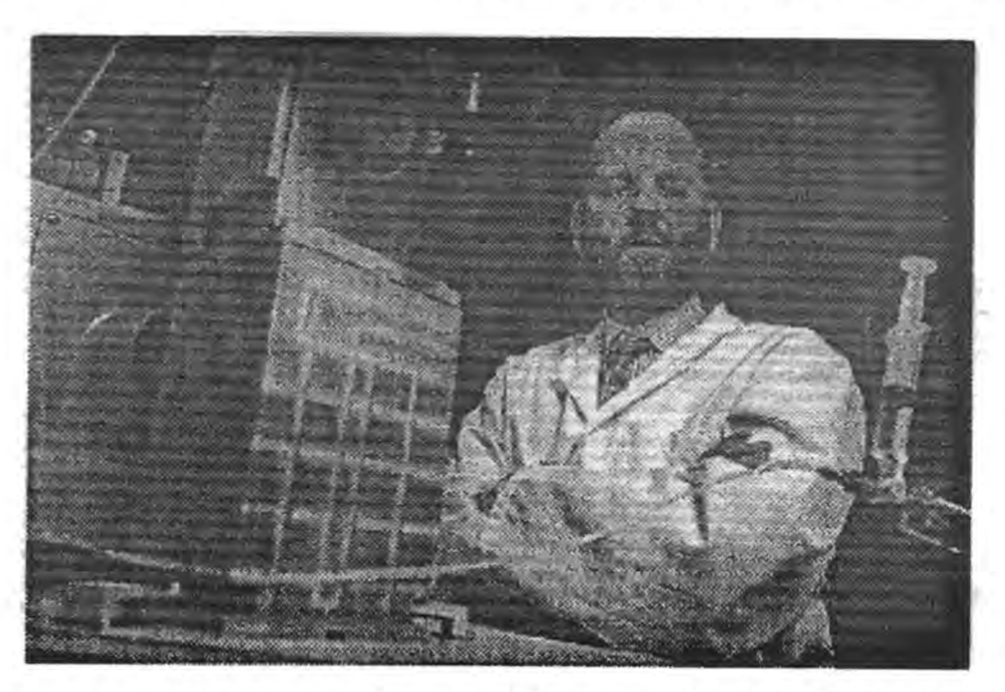
تم كل شيء بهدوء وروية وسكون في مختبر متواضع يقع بين المرتفعات الجبلية التي يلفـها ضـبـاب تلك المناطق البـاردة من جبـال اسكتلندا الموشـحة بـاللون الأخضـر الزاهي جنوب مدينة أدنبـرة، حيث يقع معـهد روزالين Roslin Institute وهناك كان الحلم الذي أصبح حقيقة في يوم 12 تموز 1996 حين تم إنجاب النعجة الصغيرة دوللي في مثل هذا اليوم ولكي تصبح فيما بعد أشهـر نعجة في التاريخ. إذ ملئت صورها الصحف والمجلات وكتب عنها أكثـر مما كتب عن أوبنهايمر ونظريته الذرية، وانتظر العلماء بـشغف مواليدها، النعجة التـي أصبحت بين عشيـة وضحاها أسطورة والتي أطلق اسمـها «دوللي» على اسم مطربة الريف دوللي بارتون (الشكل 7 - B , A).


(B)

الشكل (7- 1 A) : النعـجة الأشهـر في التاريخ «دوللي» أول كـائن حي يتم استنسـاله من خلية جسمية.

الشكل (7 - 1 , B): المغنية الريفـية البريطانيـة (دوللي بارتون لأنها الأجمل أطلق مبـدعو الاستنسال اسمها على النعجة المستنسلة).

كان الاستنسال حلماً راود كل من كيث كامبل Keith Kampbell) وآيان ويلموت (Ian Wilmut) (الشكل 7 - 2) في الحصول على قطعان من ملايين الخراف والنعاج تملأ الآفاق وتغطي قرص الشمس. وحقق الفريق البحثي الذي ترأسه (ويلموت) نجاحاً منقطع النظير في استنسال النعجة «دوللي» من خلية جسميةناضجة ومتخصصة، وبخلاف كل الآراء العلمية السائدة. وكان «ويلموت» باحثاً فذاً، حصل على شهادة الدكتوراه من جامعة كامبردج العريقة وكان بحثه يتعلق بطرائق تجميد مني الخنازير، وأجرى بحوث ما بعد الدكتوراه في جامعة كامبردج على تقنيات تجميد الأجنة الحيوانية، التحق بعدها ويلموت بمعهد روزالين في اسكتلندا والممولة بحوثه من قبل شركة PPL للعلاجيات، وعمل في مجال دراسة طرائق تحسين إنتاج الحيوانات المهمة اقتصادياً وعلى حيوانات المزرعة المهندسة وراثياً لإنتاج البروتينات العلاجية.



الشكل (7 - 2): العالم آيان ويلموت أول استنسال لكائن حي من خلية متخصصة.

بدأت طلائع النجاح تتوالى منذ عام 1994 إذ تم حل العديد من المعضلات المتعلقة بكيفية جعل الخلايا هامدة أو هاجعة quiescent . وقبل الاسترسال في هذا المنحى المعرفي يجب أن نذكر بعض الحقائق الجوهرية هي:

1 - إن الإعلان عن استنسال «دوللي» كان في الحقيقة الإعلان ولأول مرة عن إنتاج كائن حي يتم استنساله من خلية حية متمايزة ومتخصصة (كان الاستنسال حتى قبل وقت قصير من «دوللي» يتم بالانشطار الجنيني ومن خلايا منتزعة من أجنة في المراحل المبكرة من النمو الجنيني).

2 - إن نجاح عملية الاستنسال بحد ذاتها كانت إشارة عميقة الدلالة إلى إمكانية استخدام التقنية ذاتها في استنسال البشر.

3 - تحتوي الخلايا المتمايزة والمتخصصة على كامل الذخيرة الوراثية اللازمة لتكوين الكائن الحي الكامل ولكن طبيعة التنظيم الجيني الدقيق والخاضعة لآلية فتح وإغلاق Switch off - on غاية في الدقة تعمل على كبت فعالية جميع الجينات غير ذات العلاقة بوظيفة الخلية وتبقي فقط على الجينات ذات العلاقة المباشرة بوظيفة الخلية في حالة من الفعالية والنشاط الدائم طيلة فترة حياة الخلية، إذ تمتلك نواة كل خلية من خلايا الجسم دليل تعليمات (معلومات) يحدد وظيفة الخلية. وعلى الرغم من أن كل خلية تمتلك الدليل نفسه فإن الأنماط الخلوية المختلفة سوف تستعمل مقاطع مختلفة من هذا الدليل في برمجة وظائفها. ويتمثل الإعجاز الرباني في احتواء هذا الدليل على معلومات تسمح للجنين ذي الخلية الواحدة (البيضة المخصبة) بأن يصبح جنيناً، ومن ثم طفلاً وليداً. ومع أن الطفل يتنامى في نضجه الجسدي والعقلي، فإنه يستمر في استعمال المعلومات الموجودة في دليل التعليمات. وعلى الرغم من أن كلاً منا متفرد في كينونته، فإن دليل التعليمات غالباً ما يظهر تبايناً ضئيلاً، محدداً معظم السمات الجسدية وكثرة من الخصائص السلوكية التي تميز الواحد منا عن الآخر كأفراد. إن هذا الدليل الاستثنائي (الذي يعرف عادة بالمورث Genome) مكتوب بأربعة أحرف تمثل كامل أبجديته، وتتمثل بنيوكليوتيدات: الادينين (A)، والثايمين (T). وإن التسلسل الدقيق للنيوكليوتيدات في الدنا (DNA) هو الذي يعين المعلومات مثلما يعين تسلسل الحروف ويحدد ماهية ومعنى الكلمة. ويتم في كل انقسام خلوي تضاعف الدليل بكامله بحيث تحتوي كل من الخليتين الابنتين نسخة كاملة من دليل الخلية الأم. ويتألف هذا الدليل في كل من الإنسان والفأر من ثلاثة

بلايين زوج نيوكـليوتيدي فـإذا ما تمت كتـابة الأحرف (الممـثلة للنيوكليـوتيدات) في تعاقب معين بحيث تحـوي الصفحة الواحدة ثلاثة آلاف حرف، فـإن الدليل سيتألف حينئذ مـن ألف مجلد، وسيشمل المجلـد الواحد على ألف صفحة وتتـناغم مفردات هذا الدليل وتتكامل في تناسق مدهش لكي تكوّن الـبيضة المخصبـة إنساناً أو فأراً أو نعجة، والـعجيب أن 99 % من صفـات الإنسان تتماثل مع جـينات الفأر، وتؤدي الغايات نفسها.

4 - إن مفـتاح عملية الاسـتنسال يكمن في جعل الخـلايا هامدة وهاجعـة وفي هذه الحالة ستمتلك جميع جيناتها ذات الاحتمالية في التعبير عند تنشيطها من جديد.

تمتاز الخـلايا الهاجعـة بفقـدان تعبيـرها الجيني، أي لعدم إنتـاجهـا للرنا المرسال - m IRNA لجزيئات الموجهة لإنتاج البروتين، وتمتاز هذه الخلايا بسهولة التعامل معها وإمكانية الاحـتفـاظ بها لعـدة أيام بحالة مـتمـاثلة ومـلائمة، إضـافة إلى الاعـتقـاد السائد بملائمـة كروموسومات الخلايا الهاجعة وحالتها الفيزيائية المناسبة للخضوع لإعادة البرمجة.

5 - تمتاز إعادة البرمجة الجينية للخلية الهاجعة بدرجة عالية من التعقيد البالغ ويعود ذلك إلى التعقيـدات المصاحبة للتعبيـر الجيني خلال المراحل المبكرة من التطور الجنيني (في حـالة الأجنة) تتم عـملية الـسيطرة بوسـاطة بروتينات مـتـخـصـصـة وأنواع من الرنا المرسال التي تصنـع في الخلايا الطليعـية للبيـضة، ،بعد مـرور ثلاثة أيام تقريبـاً يبدأ الجنين عندها في إنتاج الرنا المرسال الخـاص به (راجع الفقرة 5 - I) وقد تعود نـسبة الولادات الحية المنخـفضة إلى التعـقيدات الهائلة المصاحـبة لتنظيم التعبـير الجيني، إذ يشكل عدم انبعـاث أحد الجينات الهامدة في الوقت المناسب وفي مـرحلة حرجة من النمو المبكر للخلايا إلى تأثير قاتل للأجنة.

6 - على الرغم من أن الإشـارات قد دلت عـلى أن نواة الخلية المانحـة كـانت تعود لخليـة ضرع ثدي كاملة التـمايز فإن «ويلموت» ذاته قد أشـار فيما بعد وبالتـحديد في عام 1999 إلى استـحالة التأكد من ذلك نظراً لاحـتواء مستنبت خـلايا الضرع المستـخدمة في التـجربة على خلايـا آقل تمايزاً وتخصـصاً تتواجـد بأعداد قليلة في الـضرع وهذا

يعني إلقـاء بعض الشكوك حـول إمكانـيـة إعـادة برمـجـة الخـلايا كـاملـة التـمـايز والتخصص ويتطلب إجراء التجربة على خلايا متخصصة أخرى.

7 - الحصول على نسبة واطئة للغاية من النسل القابل للبقاء (العيوش) لا تتجاوز 1 - 2% تم تسجيلها في عدد كبير من المختبرات.

8 - ضرورة استخدام سلالتين من نوع مختلف أحدهما تقدم الخلية المانحة للنواة وأخرى تقدم خلية البيضة وتكون الأم البديلة الحاملة للجنين المستنسل.

9 - يعتمد نجاح عملية الاستنسال على حصول التوافق بين الخليتين المانحة (للنواة) والمتلقية لها. مما يعني ضرورة تنسيق دورات تضاعف الدنا وإنتاج الرنا المرسال، وهنا يبرز دور الخلايا الهاجعة والساكنة التي لا تضاعف الدنا الخاص بها أثناء عملية النقل.

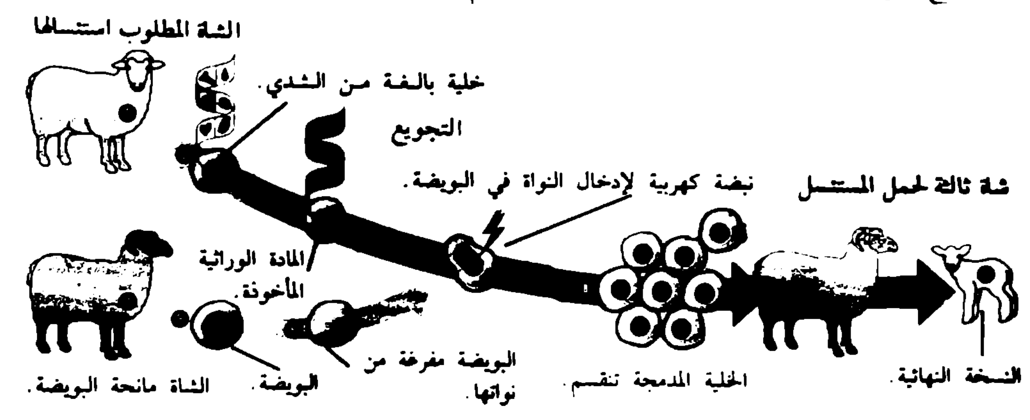
7 - 2 الأسلوب المستخدم في استنسال "دوللي":

بعد نجاح تقنيات النقل النووي المستخدمة في استنسال الحيوانات الاقتصادية من خلايا جنينية والإنجاز الذي حققه الباحث «ويلموت» في استنسال الحملين «ميكان» و «موراك» في صيف عام 1995 من خلايا مستزرعة مشتقة من جنين عمره تسعة أيام فقط اتجهت جهوده نحو الاستنسال من خلايا مستزرعة أكثر تمايزاً، حيث اختبر إمكانية خلايا الأرومة الليفية الجنينية (الفايبروبلاست) على المساهمة كخلايا مانحة للنواة في تقنية الاستنسال وكذلك الخلايا المأخوذة من ضرع نعجة حامل في الأشهر الثلاثة الأولى من حملها.

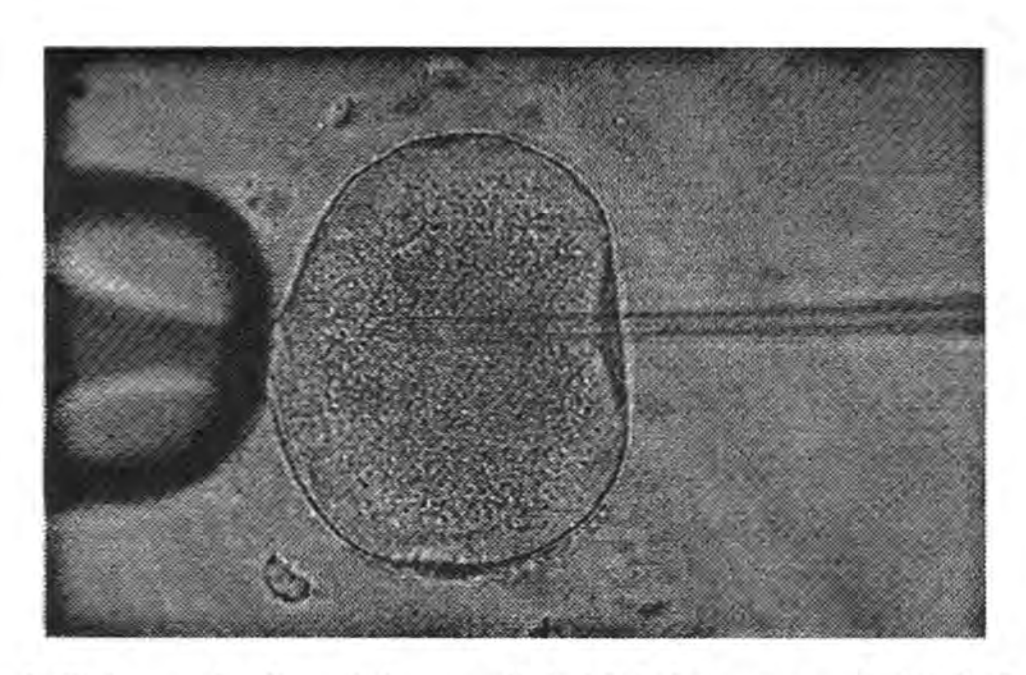
وهذا ما تم في استنسال النعجة «دوللي» (الشكل 7 - 3)، إذ استخدم «ويلموت» خلية جسمية من ضرع نعجة حامل ملساء الوجه Finn Dorset Ewe وكان اختياره موفقاً، حيث تكون خلايا الضرع في فترة الحمل في قمة الفعالية والنشاط. تحتوي خلية الضرع بطبيعة الحال على كل الجينات اللازمة لتخليق وإنتاج نعجة كاملة مطابقة وراثياً للأصل الذي اشتقت منه الخلية، ولكن الجينات ذات العلاقة بوظيفة هذا الخلية هي التي تكون فعالة وظيفياً، ولغرض تسكين جميع جينات الخلية وجعل الخلية هامدة وهاجعة يتم

تجويع الخلية من خلال تنمية الخلايا على أوساط غذائية فقيرة في محتواها من مصل جنين البقر وعموماً فإن الأوساط تحتوي بحدود 20/1 مما تحتاجه الخلية من المواد المغذية، حيث تنمى الخلايا على هذه الأوساط لمدة 5 أيام مستمرة، حتى تدخل الخلايا في طور Go وتصبح هامدة، يتم إيقاف عمل كل جينات الخلية (Switch off)، أخذ الباحث بعدها بيضة غير مخصبة من نعجة اسكتلندية سوداء الوجه Black face Ewe، حيث أخضعت للتطويع المجهري باستخدام ماصة دقيقة بسمك الشعرة لغرض وخز أو ثقب خلية البيضة وإزالة نواتها (الشكل 7 - 4).

أعقب ذلك القيام بدمج خلية الضرع الجسمية وخلية البيضة منزوعة النواة بالاندماج الكهربائي Electric Fusion باستخدام نبضات كهربائية خفيفة (راجع الفصل السادس)، حيث اندمجت الخليتين كاندماج فقاعتي الصابون وباستخدام نبضة كهربائية ثانية استهدفت محاكاة النواة المانحة المدمجة في خلية البيضة المتلقية لانفجار الطاقة في عملية الإخصاب الطبيعي وبتنمية الخلايا في وسط زرعي متكامل ويحوي على كافة المواد المغذية فإن جميع جينات الخلية سيتم إيقاظها من سباتها ويتم تنشيطها وتتحول بذلك خلية الضرع إلى شبه خلية جنينية حيث تبدأ بالانقسام والتكاثر.



الشكل (7 - 3): التقنية التي استخدمها «آيان ويلموت» في استنسال «دوللي» في معهد روزالين في أدنبرة/ اسكتلندا



الشكل (7 - 4): تستخدم ماصة دقيقة في إزالة وسحب النواة من البيضة بعد تثبيتا بالماصة الداعمة (إلى اليسار).

وفي الحقيقة فإن الدفعة الأولى من النبضات الكهربائية تعمل على حث خلية البيضة منزوعة النواة على تقبل ودمج خلية الضرع الجسمية والدنا الذي تحتويه في نواتها، أما الدفعة الثانية من النبضات الكهربائية فإنها تعمل على تنبيه Triggered أو تفجير الفعاليات الكيميائية الحياتية للخلية ومراحل انقسام الخلية من خلال تحفيزها للعامل المسؤول عن الانقسام Division Promoting Factor (DPF) . واستغرقت عملية نمو الخلية المدمجة في الوسط الزرعي ذو المحتوى الغذائي الكامل لمدة أسبوع، حيث تم بعد ذلك ازدراع الجنين المتنامي في رحم نعجة اسكتلندية ثالثة (سوداء الوجه)، وبعد فترة حمل كاملة ولدت النعجة الصغيرة «دوللي» في 5 تموز 1996 وهي نسخة طبق الأصل للنعجة الأولى (ملساء الوجه) التي أخذت منها خلية الضرع الجسمية. ورغم هذا الإنجاز الكبير الذي نال صدى إعلامي كبير وواسع النطاق فإن الصورة النهائية للإنجاز لم تكن بدون شوائب ومنها ما تم ذكره آنفاً بخصوص خلية الضرع المأخوذة كنواة مانحة وصعوبة التأكد من درجة تمايزها في مستنبت الخلايا المأخوذة من الضرع، أما النقطة المهمة الأخرى

فهي نسبة النجاح الواطئة، حيث أجرى الباحث «ويلموت» وفريقه البحثي 277 محاولة (نواة مانحة أدمجت في بيضة مفرغة من النواة) ونجحوا في الحصول على 29 جنيناً فقط نجحت بالبقاء لمدة تزيد عن 6 أيام ولم يبقى فيما بعد من الرقم الأخير سوى «دوللي» التي أكملت فترة الحمل بنجاح، وتم في تجارب أخرى أجريت في نفس المعهد الحصول على 9 حملان أخرى.

ومن المهم ملاحظة أن الأسلوب المستخدم من قبل «ويلموت» على الرغم من الدوي الإعلامي وكونه نصراً علمياً مؤكداً فإنه غير عملي بالنسبة للمنظور الاقتصادي مقارنة بأسلوب الاستنسال أو الانشطار الجنيني، إذ تبرز العديد من المشاكل التقنية المصاحبة لأسلوب الخلايا الهاجعة والتحكم في الانبعاث الجنيني إضافة إلى مشكلة خطيرة تتمثل بكون حجم الكائنات الحية المستنسلة الوليدة يكون أكبر بكثير من حجم مثيلاتها الطبيعية ويقول «ويلموت» بأن كل المحاولات التي بذلت لحل هذه المشكلة قد باءت بالفشل، حيث يمكن للزيادة الحجمية أن تعرض الأم ووليدها للخطر (بلغ وزن الحملان المستنسلة بحدود تسعة كيلوغرامات مقارنة بمعدل وزن الحمل الطبيعي عند الولادة والبالغ بحدود 4.75 كيلوغرام).

وفي الحقيقة فإن التقنية المستخدمة في الاستنسال يمكن أن تثير العديد من التساؤلات والتي تتعلق باستخدام الاندماج الكهربائي في دمج خلية الضرع المانحة للنواة في البيضة منزوعة النواة وعدم استخدام التطويع المجهري وتقنية الجراحة المجهرية في إيلاج الخلية المانحة للنواة والدرجة التي يمكن أن يسهم فيها سايتوبلازم خلية البيضة في توجيه نواة خلية الضرع نحو التحول إلى خلية تحاكي الخلية الجنينية من حيث قدرتها على التكاثر والانقسام.

وتساؤل آخر يمكن أن يثار وهو ماذا يمكن أن يحدث لو تم زرع نواة الخلية دون الخلية ذاتها في البيضة منزوعة النواة؟ هل ستبدأ خلية البيضة الحاوية على نواة كاملة العدد الكروموسومي بالانقسام كخلية جنينية حين يتم تحفيزها كهربائياً؟ أم أن سايتوبلازم الخالية المانحة للنواة ضروري لتحول النواة المانحة إلى خلية جنينية متنامية؟ هذا ما يتعلق

بالتساؤلات أما ما يتعلق بالأسرار التقنية وهي عـديدة ويتمثل أهمها بالطريقة المستخدمة في تجويع الخلايا لتحويلها إلى خلايا هامدة (ساكنة)، حيث يتم تحفيز وحث حالة الهمود بزراعة الخلايا في طبقة مغذية من وسط GIBCO أو وسط TC 199 الحاوي على تركيز واطيء من المصل (0.5 % FCS بدلاً من 10 % FCS) ولمدة 5 أيام.

أما بالنسبة إلى تنشيط الخلية الواهبة للنواة المندمجة في البيضة منزوعة النواة، فإن العملية تتم في وسط تنشيط خاص هو وسط M2 الحاوي على 10 % من FCS و 5 مايكرومول من النوكودازول (في حالة التنشيط المتأخر) يتم بعدها استخدام النبضات الكهربائية المثبتة للتنشيط.

ويقول آيان ويلموت» بأنه على الرغم من قيام باحثين آخرين باتباع تقنيات مشابهة للاستنسال ولكنهم فشلوا بسبب عدم قدرتهم على تمييز العامل المفتاح لنجاح العملية وهو أن الخلية الواهبة (Donor Cell) يجب أولاً أن تعامل ببعض المواد الكيميائية التي تعمل على إعادة تنظيم (reset) الساعة البايولوجية للخلية (Biological clock) بالطريقة التي تجعل الدنا الخاص بها يميل إلى التضاعف لتكوين دنا جديد أو ما يمكن أن يطلق عليه إعادة برمجة تعبير الجين (Reprogramming of Gene Expression) .

ولكي نوضح الصورة التي يلفها الغموض، لا بد من التأكيد مرة أخرى على بعض الثوابت البايولوجية ومنها أن كل خلية تقريباً في الجسم تحتوي على الخريطة الوراثية للفرد وإن البويضات والمضغ المأخوذة من فصائل مختلفة تحتوي على نوى منظمة للجينات تقوم بتشغيل أو إيقاف الجينات عن العمل في مختلف مراحل الحياة.

فلو فرضنا أن البويضة لقحت بالحيمن وتم تخصيبها فإن الخلية المخصبة تبدأ بالانقسام إلى خليتين وهذه بدورها تنقسم إلى أربعة خلايا وفي انقسام ثالث تصبح ثمان خلايا (والسر هنا هو قبل الانقسام الرابع) فما هو السر الرهيب لعملية الخلق؟؟ إن هذه الخلايا الثمانية يمكن لكل منها أن تكون جنيناً حيث يمكن أخذ سبع خلايا وحفظها باستخدام التبريد بدرجة 160 تحت الصفر وبذلك يمكن حفظها لمدة 10 آلاف سنة وهذه

التقنيـة مستخدمـة في العديد من المختبـرات ومنها مراكز حفـظ السلالات كالـ American Type Culture Collection (ATCC) في روكفيل/ واشنطن.

وتترك الخليـة الثامنة لتتابع حـياتها الرحـمية فتنتج كـائناً كاملاً، والسر في الانقـسام الرابع بالذات لأن الخلايا بعد هذا الانقسام تبدأ بالتخصص، أي أن الخلايا ولحد الانقسام الثالث (8 خلايا) تكون غيـر متخصصة وعند حدوث الانقـسام الرابع أي في مرحلة (16 خليـة) تبدأ فـي التخـصص، فـما هي الآليـة التي يبـدأ بهـا التخـصص بحـيث تكون كل مجموعة من الخلايا عضواً معيناً في الجسم، وما هي الإشارة التي تعطى لكل خلية بحيث توقف عمل جينات معينة وتقوم بتنشيط جينات أخـرى تكون ملائمة لتخصصها اللاحق، وما هـي الدقة العـالية والإعجـاز لكي يسـتمر الجنـس البشري جـيلاً بعـد جيل علمـاً بأن مسـتوى التنظيم العاليـة مهم لأن أي خطأ يعني تكون 3 أو 4 قلوب أو أكبـاد مثلاً بدون ساقين أو يدين أو دماغ وهكذا.

وعلماء البـايولوجيـا يعرفون الآن أنه إذا أمكـن التحكم بالنوى أو بالإشـارة المنظمة للجينات فإنهم سيتـمكنون من تجديد نمو الخلايا العصبية التي تعود للتوالد بصـورة طبيعية بعـد انقطاع أو تلف الحـبل الشوكي، أو قـد يكون بوسـعـهم أن يحيـدوا (Deprogram) إحدى الخلايا الجلدية ويوقظوا فقط الجينات ذات العلاقة بالوظيفة المطلوب تعويضها.

إن العواقب غير المرغوبة لتقنيات حديثة كالاستنسال ربما لا تزال غير مفهومة أو غير ظاهرة للعيـان. إذ يذكر «ويلمـوت» في مؤتمر خصص لمناقـشة الاستنسـال عقد في شـهر حزيران 1997 في فرجينيا/ الولايات المتحدة:

«إن برمجة الجينات في خـلية الخراف الناضجة تعمل على تجديـد شباب هذه الجينات ويمكنها الازدواج لاحقاً مع خلية بيضة مستلمة منزوع منها الدنا الخاص بها والجنين الناتج يمكنه النمو ليكون لاحقاً نسيلة تؤامية متطابقة للحيوان الناضج، ويستطرد قائلاً إن النعجة ذوللي مستمرة في النمو بصورة طبيعية وإنها يمكن أن تتكاثر بصورة طبيعية في الخريف»، وهذا مـا تم فعـلاً في 24 نيـسان 1998، حيث أعلن عـن ولادة الحمل بوني (Bonnie) (الشكل 7 - 5).



الشكل (7 - 5): أول ولادة ناجحة للنعجة «دوللي» كان الحمل (Bonnie) بوني ولد من تزاوج وحمل طبيعيين.

في حين بينت الدراسات اللاحقة أن برمجة الجينات في خلية الخراف الناضجة وعلى العكس مما أشار إليه «ويلموت» لن تعمل على تجديد شباب الجينات بل إن «دوللي» في الواقع عمرها من عمر الخلية الناضجة التي استنسلت منها وإنها تعاني من الشيخوخة المبكرة (راجع الفقرة 7 - 4 الاستنسال والشيخوخة المبكرة).

إن التطوير المستمر لتقنيات الاستنسال يمكن أن ينتج عنه إرساء أسس تقنية متقدمة فعالة وغير مكلفة اقتصادياً، إذ يشير عالم فسلجة التكاثر في جامعة موناش في ملبون/ استراليا (آلان تراونسون Alan Trounson) إن تقنية «ويلموت» في الاستنسال يتم اختيارها كخط جانبي فقط Side line وإن الهدف الأساسي للتجارب يتركز على إجراء التزاوج بين ذكور وإناث ماشية عالية النوعية ومنتجة واستخدام تقنية الاستنسال الجنيني لمضاعفة عدد الأجنة الناتجة لعدة مئات من المرات وهي تقنية أكثر ضماناً وأقل تكلفة من مجرد استنسال خلية جسمية من حيوان ناضج ذو صفات محددة.

أما الباحث المتخصص بفسلجة التكاثر في جامعة وسكنسون في ماديسون/ الولايات المتحدة فيشير إلى وجود فترة زمنية لا تقل عن عام كامل حتى في حالة تطبيق تقنية الاستنسال بنجاح وانسيابية نظراً للمدة الزمنية الطويلة نسبياً التي تتطلبهامدة حمل الأبقار (هذه المدة الزمنية تفصل بين ابتكار التقنية المستحدثة للاستنسال وبين الحصول على حيوان مستنسل على أرض الواقع.

7 - 3 الخلايا الجذعية والاستنسال العلاجي:

تشكل تقنية إنتاج الخلايا الجذعية والاستنسال العلاجي أحد أهم التطبيقات لتقنية الاستنسال، ويختلف الاستنسال العلاجي عن الاستنسال التكاثري بكونه لا يستهدف إنتاج نسيلة كاملة وإنما يستهدف إنتاج أجنة تتنامى لكي تصل فقط إلي المرحلة الجنينية اللازمة لفصل وعزل خلاياه الجذعية، حيث يمكن استعمال الخلايا الجذعية المشتقة من الجنين في علاج أمراض مختلفة كالإيدز وداء باركسون والحثل العضلي، إضافة إلى إمكانية الحصول على أنسجة بشرية يمكن استخدامها في غرس الأنسجة والأعضاء.

هذا وقد انهمك علماء بايولوجيا النمو والبايولوجيا التحولية في عزل واشتقاق الأنوية المتخصصة بتنظيم الجينات، ويمكن الحصول على الأنوية المنظمة من طريقين أساسيين: الأول هو من الخلايا بالغة النمو والمتخصصة والتي تتطلب تقنية بالغة التعقيد والصعوبة، أما الثاني فيتضمن اشتقاق الأنوية من الأطوار الجنينية المبكرة. وتمكنت شركة أونتوجيني Ontogeny Inc من استحصال براءات اختراع لـ 30 نواة تنشط الجينات المسؤولة عن مختلف الوظائف. ويعمل العلماء الآن على إنشاء خطوط دائمة وثابتة من الخلايا الجذعية الجنينية ذات القدرة على التمايز حسب الطلب والحاجة.

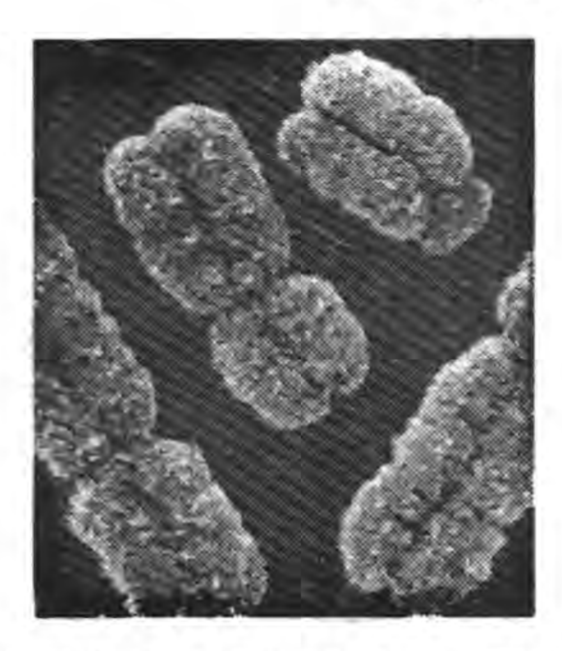
إن الحصول على خطوط من الخلايا الجذعية البشرية المكونة لنخاع العظم على سبيل المثال يتيح الفرصة للعلماء لاستنبات نخاع لزرعه لضحايا مرض السرطان، أو معالجة مرض فقر الدم المنجلي بتنشيط الجينات المسؤولة عن إنتاج الدم، وهذا ما تحقق فعلاً على يد الباحث «ستيوارت أوركين»، حيث تمكن هذا الباحث من إنتاج دم جديد من الخلايا الجذعية الفأرية، وهو إنجاز كبير، على الرغم من أن الدم الجديد كان غير فعال وظيفياً عند نقله إلى حيوانات أخرى .

يشكل إنتاج خلايا جذعية تتوافق مع مريض معين وذلك بإنتاج جنين باستخدام تقنية النقل النووي المعتمد على خلية مانحة من جسم المريض وبيضة إنسان كخلية متقبلة أحد الحلول الواعدة لمشكلة عدم التوافق النسيجي، حيث يمكن للخلايا المغترسة بهذه الطريقة وعلى الرغم من احتمال كونها غير متوافقة كل التوافق مع خلايا المريض فإن بالإمكان التحكم بالاستجابة المناعية الحاصلة بعد الغرس. ويشكل غرس أو زرع الأعضاء الغريبة Xenotransplantation أهمية خاصة في هذا المجال، حيث يواجه عدد كبير من المرضى من الذين يحتاجون إلى زرع الأعضاء خطر الموت قبل توفر المتبرعين المناسبين، ويجابه هؤلاء المرضى أحد المشاكل الرئيسية المتعلقة بزرع الأعضاء وهي الاستجابة الرافضة فرط المزمنة Hyperacute Rejection Response والتي تعمل على التدمير السريع للعضو المزروع بين الأنواع بسبب تواجد أجسام مضادة تتواجد طبيعياً في الدورة الدموية البشرية والتي يمكنها التمييز والتعرف المباشر على مستضدات الأعضاء الغريبة في الأنسجة المزروعة وهذه الأجسام المضادة تستهل أو تبدأ بإظهار استجابة يتوسطها العامل المتمم Complement - mediated response والتي غالباً ما تكون سريعة وتسبب تحلل الأنسجة المزروعة. وتمكن العلماء فعلاً في عام 2000 من إنتاج خنازير تفتقد للتحريض المناعي وبالتالي يمكن استخدام أعضائها المختلفة في تجارب الغرس دون أن يولد ذلك استجابة مناعية خطرة في جسم المتلقي.

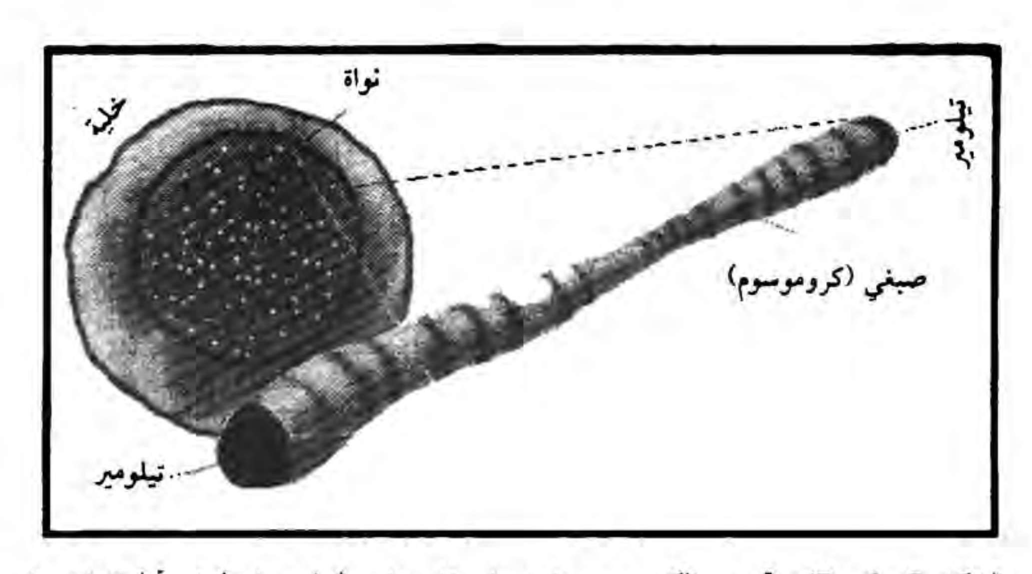
وتعمل العديد من الشركات المتقدمة وفي ظل تنافس شديد على تطوير تقنية الخلايا الجذعية، منها شركة «أونتوجيني» وشركة التقنيات المتقدمة للخلية، إضافة إلى شركة «جيرون» التي اندمجت مع شركة روزالين بايوميد. هذا وتثير مسألة استخدام الأجنة واستنسالها لأغراض علاجية المزيد من الاعتراضات الأخلاقية والقانونية، ففي بريطانيا على سبيل المثال يجيز قانون صادر في عام 1990 حول التخصيب البشري وعلم الأجنة يجيز إجراء البحوث حول الأجنة البشرية حتى يومها الرابع عشر على أساس أن الجنين في هذه المرحلة لا يمتلك على الإطلاق وسيلة الشعور بالألم أو الإحساس بما يحيط به ولكن القانون لا يتطرق بطبيعة الحال إلى الاستنسال العلاجي الذي ظهر في فترة لاحقة لصدوره.

7 - 4 الاستنسال والشيخوخة المبكرة:

كان لاكتشاف إصابة النعجة المستنسلة «دوللي» بالشيخوخة المبكرة وقع الصدمة الهائلة على كافة مؤيدي تقنيات الاستنسال من الخلايا الجسمية وتطبيقاتها. فما الذي حدث فعلاً، وكيف توصل العلماء إلى هذه الحقيقة التي تهدد وبصورة بالغة الخطورة كل إنجازات تقنية الاستنسال والطموح والآمال التي عقدت عليها للهروب من حلقة «الفناء الذاتي» نحو رحاب الخلود التلقائي الدائم، حيث اكتشف العلماء أن كروموسومات النعجة «دوللي» متقاصرة وأقصر مما ينبغي أن تكون عليه في عمرها، وكانت هذه الحقيقة جزءاً من رسالة وجهها «آيان ويلموت» إلى مجلة الطبيعة (Nature) في شهر آيار 1999 يخبرهم فيها بأن العمر الحقيقي لنعجة «دوللي» هو تسع سنوات وليس ثلاث سنوات، إذ وجد أن الدنا التي تقع على طرفي الكروموسومات والتي لها علاقة في عملية التعمر (التقدم في السن) أقصر عند «دوللي» من أية نعجة أخرى في عمرها، وإن هذه الظاهرة كانت بدرجة أقل عند خروفين تم استنسالهما من خلايا جنينية، حيث تم التوصل إلى استنتاج محدد وهو أن المحتوى الوراثي للكائن المستنسخ يعكس في الحقيقة سن الكائن البالغ الذي استخدمت خلاياه لاستنساله.



الشكل (7 - 6 - A): الكروموسومات البشرية مكبرة وتظهر التيلوميرات على أطرافها.

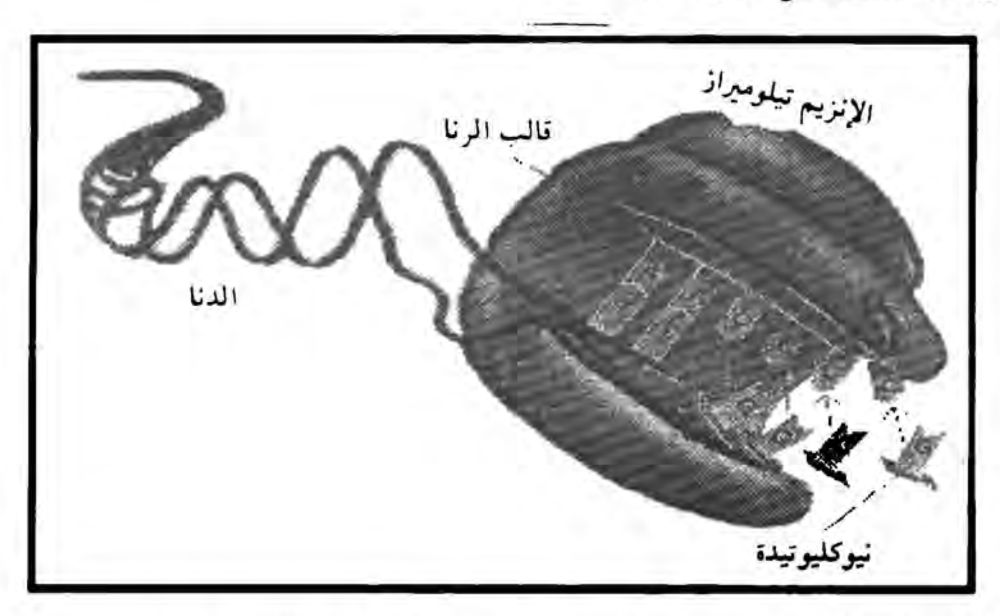


الشكل 7 - 6 - B) : تحتوي الكروموسومات على قلنسوات (تيلوميرات) في أطرافها تعمل هذه القلنسوات على استقرار وثبات الكروموسومات وتمنع التصاقها مع بعضها.

ولغرض التوسع بمزيد من التفصيل عن كيفية حدوث هذه الشيخوخة المبكرة في الكائنات الحية المستنسلة ينبغي الإشارة إلى أن العلماء توصلوا إلى وجود عقد أو قلنسوات Caps تغطي طرفي الكروموسومات (الشكل7 - 6) وتحافظ على ثبات واستقرار الكروموسومات وتمنعها من الالتصاق إحدها بالآخر خلال عملية التضاعف، وتسمى هذه العقد أو القلنسوات بالتيلوميرز Telomeres وتتكون هذه التيلوميرات من تتابعات خماسية القواعد تتكرر بكثرة، ولكل نوع حياتي متوسط يميز هذا النوع عن غيره من الأحياء، ففي الإنسان تتكرر بحدود 2000 مرة، وفي الحقيقة فإن فقدان منتظم لهذه التيلوميرات يحدث مع كل دورة تضاعف وانقسام خلوي وبعد 50 انقساماً تكون الخلية قد فقدت الجزء الأكبر من هذه العقد ومنها جينات طرفية الموقع وقد تكون مهمة لحياة الخلية.

وتمكن العلماء من معرفة آلية الخلود في الخلايا السرطانية والتي تنقسم إلى ما لانهاية وتبقى خالدة، حيث وجد العلماء أن التقاصر الحاصل في نهاية كروموسومات الخلية السرطانية وفقدان التيلوميرات يتم تعويضه بوجود فعالية عالية لأنزيم يعرف بأنزيم التيلوميراز Telomerase الذي يمتاز بصفة فريدة، حيث يمتلك قالباً من الرنا ويعمل على

بقاء وحدات تيلوميرية جزئية من المكررات التيلوميرية (الشكل 7 - 7). وبذلك يمكن أن يشكل إضافة هذا الأنزيم إلى مزروع الخلايا المستنبتة المانحة للنواة أو تحفيز آلية التعبير الجيني لإنتاجه في هذه الخلايا أحد الحلول الناجعة لإعادة عقارب الشيخوخة الخلوية إلى الوراء، حيث أعلن في نيسان 2000 عن نجاح العلماء في شركة التقنيات المتقدمة للخلية في وورتشستر/ ماساشوستس ـ الولايات المتحدة عن استنسال ست بقرات بخلايا شابة ويافعة استنسلت من خلايا مسنة.



الشكل (7 - 7): يمتاز أنزيم التيلوميراز بخاصية احتوائه على قالب خاص لتركيب الدنا التيلوميري (يتكون من جزيء مفرد من الرنا) يتكون من التعاقب AACCCC ، حيث يعمل الأنزيم على رصف أحد شريطي الدنا على هذا القالب وتبدأ إضافة النيوكليوتيدات المتممة والحصول على مكرر تيلوميري TTGGGG وعند اكتمال الوحدات الجزيئية التيلوميرية آنفة الذكر يعمل الأنزيم على إنتاج ووصل وحدة تيلوميرية (مكررة) وذلك بالانزلاق إلى النهاية الجديدة للكروموسوم.

الفصل الثامن

الاستنسال البشري

النواحي الأخلاقية والدينية والفلسفية

8 ـ الاستنسال البشري ... النواحي الأخلاقية والفلسفية والدينية

8 - 1 النواحي الأخلاقية والفلسفية

8 - 1 - 1 مقدمة تاريخية:

كان اكتشاف النار الشرارة الأولى في رحلة التقدم العلمي التي ما أن تسارعت خطاها بقوة حتى لم يعد بإمكان آية قوة إيقافها. فبين أطلال «موهنجودارو» أول حضارة في بلاد السند، وآبداع حضارات وادي الرافدين سومر وأكد وبابل، وجمال وتألق الحضارة الفرعونية على ضفاف وادي النيل، سجل الإنسان أروع الانجازات الحضارية في سلسلة متواصلة من مراحل التقدم العلمي المتسلسلة.

أما الثورة العلمية البايولوجية فتعود إلى عهد أكثر قرباً وتحديداً عام 1543، حين تم وضع الجسد الإنساني تحت رحمة مشارط التشريح على يد «فيساليوس» وهو ما كان محرماً أشد التحريم قبل ذلك التاريخ. وفي آواخر القرن التاسع عشر والإطلالة الخجولة على القرن العشرين برز إلى الواجهة موضوع (تحسين النوع البشري)، حيث ترك «كارل بيرسون» في يوم من أيام شهر كانون الثاني سنة 1901 أعماله بمكتبة كلية الجامعة في لندن ليكتب إلى صديقه «فرانسيس جالتون» عن موضوع له أهمية قومية بالغة (على حد تعبيره) والموضوع هو (التربية من السلالات الأصلح) وعن أهمية قضية الخصوبة في هذا البلد (انكلترا)، وكان «جالتون» نفسه من المتحمسين النشطين لليوجينيا (علم تحسين الإنسان)، وفي عام 1926 نشرت الجمعية الأمريكية كتاب (علم تحسين النسل. .سؤال وجواب) أكدت فيه للقراء أن اليوجينيا ليست خطة لخلق سوبرمان أو لتربية البشر كما تربى الحيوانات ولكنه أكدّ أن اليوجينيا سوف تزيد من عدد العباقرة وسترعى التزاوج

الأكثر انتقائية، لقد كانت نتيجة التفكير بموضوع تحسين مورثات الإنسان هو التطبيق العملي لما أسماه «فرانسيس جالتون» بتحسين النسل (Eugenics) وهو تصميم السلوك الاجتماعي لتحسين التركيب الوراثي للعشيرة في الإنسان، إذ حسب هذا المفهوم يجب أن ينتج أصحاب التراكيب الوراثية المتفوقة الجزء الأكبر من النسل، وينتج أصحاب التراكيب الوراثية المتخلفة الجزء الأصغر أو لا ينتجون جيلاً ثانياً على الإطلاق، ولكن الواقع الفعلي يتطلب الشجاعة والكثير من الحكمة لغرض التحديد بدقة من يجب ومن لا يجب أن ينجب أطفالاً، فمن الصعب تحديد كيف ومن يملك الحق في إصدار القرار، فالجزء الأكبر من الطراز الوراثي (Genotype) هو غير معروف والأسس التي يتم على ضوئها انتخاب أنسب الأنواع للبيئات والمجتمعات في الحاضر والمستقبل لم تستقر أو تتخذ طابعاً ثابتاً بعد، والإرادة ليست مطلقة التحكم في عملية التكاثر، وفي الحقيقة فإن أي تحرك إرادي لتحسين النسل في المجتمع يتطلب عشيرة سكانية واعية تهتم بعمق بنوعية مجمعها الجيني.

إن المأساة الرهيبة قد وقعت فعلاً نتيجة تبني الحكومات لمثل هذه الآراء المتطرفة في أوربا والولايات المتحدة التي بدأت منذ عقدي العشرينيات والثلاثينيات من القرن المنصرم بالتعقيم الإجباري لمواطنيها من ذوي القابليات العقلية المتخلفة، وما زالت قضية «العار التاريخي» تتفاعل في بعض الدول الأوربية، كالسويد وسويسرا وفرنسا والنروج وفنلندا، إذ اعترفت وزيرة الشؤون الاجتماعية ف يالسويد، أن الدولة باشرت التعقيم القسري في الفترة الزمنية الممتدة من عام 1935 - 1976، وأن قرابة 60 ألفاً من النساء والرجال قد تم تعقيمهم قسراً، في سويسرا تم تعقيم الكثير من الأفراد وبموجب قانون صدر عام 1928 ويعتقد بأن السلطات قد استوحت مبادئها في التعقيم القسري من نظريات عالم النفس السويسري «أوجست فوريل» حول علم الصحة العرقي، حيث شمل التعقيم القسري أفراد يتصفون بخصائص عرقية غير مرغوبة كالتخلف العقلي وضعف حاسة البصر، وفي فرنسا شملت الفضيحة تعقيم قرابة 15 ألف امرأة من نزيلات المستشفيات النفسية ويعانين من حالات تخلف عقلي بسيط يتمثل في عدم القدرة على

التحصيل الدراسي الجيد والاضطرابات العاطفية والاجتماعية وكانت اللجنة القومية الفرنسية للقيم والأخلاقيات قد حذرت في العام 1960 من إجراء التعقيم التعسفي.

وقد اقترح موللر Herman.J. Muller الحائز على جائزة نوبل بالطب ما أسماه خطة (الاختيار الجنيني) وهي خطة تطالب الوالدين بالتخلي عن رغباتهما الأنانية في استمرار صفاتهما الوراثية والتحول عنها إلى إنجاب الأطفال بواسطة التلقيح الاصطناعي الذي يؤمن حسب رأيه تطوراً مثمراً للإنسان.

كما بين هيرمان موللر بوضوح منذ سنوات طويلة أن الموهوبين الأكثر قدرة وتكيفاً مع المجتمع يجب أن يكونوا أسراً ضخمة، بينما أولئك الأقل قدرة وتكيفاً مع المجتمع يجب أن ينجبوا أقل من نصيبهم في النسل، وكان مولر يعتمد على التعلم وتنوير الرأي العام، والاختيار الإرادي لإيجاد الرغبة في تقوية الجبلة الجرثومية (المورثات) germ plasm للجيل التالي، ولتسهيل هذه الخطة اقترح التلقيح الصناعي Artificial Insemination للحالات التي تكون فيها المرأة طبيعية وسليمة صحياً وترغب في الأطفال وهي غير متزوجة أو متزوجة من رجل عقيم أو غير مؤهل وراثياً، وفي هذه الحالة سوف تستخدم بنوك الحيوانات المنوية Sperm banks والمجمد فيها الحيوانات المنوية بطريقة سليمة محمية من أي إشعاعات أو أخطار بيئية أخرى، ولو أن الحيوانات المنوية المحفوظة بهذه الطريقة لن تكون بالحالة الجيدة التي يمكن أن تكون عليها الحيوانات الطازجة، إذ يلزم من الحيوانات المنوية المحفوظة 14 حقنة في المتوسط لإحداث الحمل في المرأة، وأمكن إنتاج طفل باستخدام الحيوانات المنوية لرجل توفي بالفعل.

إجري التلقيح الصناعي بنجاح في الحيوانات في نهاية القرن الثامن عشر وأصبح في الثلاثينيات موضع اهتمام مربي الحيوانات. ولقد بدأ استخدامه منذ منتصف القرن التاسع عشر بشكل متفرق على نساء يرغبن في الإنجاب برغم عقم أزواجهن، وثمة تقرير نشر في مارس 1934 بمجلة العلوم الأمريكية يقول أن عدد النساء اللاتي يطلبن السائل المنوي بالولايات المتحدة قد بلغ رقماً يتراوح ما بين ألف وثلاثة آلاف امرأة كل عام، وإن هؤلاء النساء عادة ما يطلبن السائل لأفضل الرجال بيولوجياً، وإن التلقيح الصناعي للأغراض اليوجينية «سيمكن البشر من ميزة لم يكن يحظى بها إلا النباتات والحيوانات».

ويقول موللر: إن دور النساء في التلقيح الصناعي لا يتعدى دور قوارير الحمل للحيوان المنوي للرجال العظام وحيث يقدر أن الرجل ينتج ما بين عمر 35 سنة و 55 سنة بحدود 340 بليون حيوان منوي مقابل إنتاج المرأة لعدد محدود من البويضات فإن رجلاً واحداً يستطيع أن يخصب في العام الواحد 5 ملايين امرأة». هذا الرأي المتطرف هو واحد من الأمثلة على ما يمكن أن يحل بالبشرية من دمار وخراب حينما يحاول الإنسان أن يغير نواميس الطبيعة، وهنا نذكر القرآن الكريم وقوله تعالى: ﴿**لله ملك السموات والأرض، يخلق ما يشاء، يهب لمن يشاء إناثاً، ويهب لمن يشاء الذكور، أو يزوجهم ذكراناً وإناثاً، ويجعل من يشاء عقيماً، إنه عليم قدير**﴾ (سورة الشورى/ الآية 45 - 50). وقال تعالى: ﴿**الله يعلم ما تحمل كل أنثى وما تغيض الأرحام وما تزداد، وكل شيء عنده بمقدار**﴾ (سورة الرعد/آية 8).

وقطع علماء آخرون شوطاً كبيراً في تأسيس مصارف أو بنوك للأجنة المجمدة التي لا يزيد عمرها على يوم واحد، ويحفظ كل جنين في حاوية خاصة تحمل ملصقاً مدون فيه الصفات العامة للجنين، كالجنس وللون ولون العينين ومستوى الذكاء والذي يغرس في رحم امرأة مرضعة تحت الإشراف الطبي، ويمكن أن يكون لهذه الأجنة سوق رائجة إذا ما كانت ناتجة عن نطف وبويضات لنجوم السينما والرياضة أو العباقرة. وقد تم الإعلان عن بيع بويضات لأجمل النساء وعارضات الأزياء على صفحات شبكة الأنترنت (الشكل 8 - 1).



الشكل (8 - 1): بويضات ملكات الجمال وعارضات الأزياء عرضت للبيع في شبكة الانترنت وبمبالغ تراوحت بين 25 ألف - 75 ألف دولار.

أطفال أنابيب الاختبار:

منذ ولادة الطفلة لوسي براون عام 1978 في إنكلترا فإن عهداً جديداً من صراع البشرية ضد العقم قد بدأ. ولدت الطفلة لوسي من جراء تخصيب بويضة والدتها في أنبوب اختبار ومن ثم زراعة البويضة المخصبة في رحم الأم. وتستمر التجارب لمعرفة مدى إمكانية حفظ البويضة قبل الإخصاب وإمكانية إنتاج التوائم في أنابيب الاختبار ولتوفير الظروف الملائمة لبقاء البويضة المخصبة في أنبوبة الاختبار لفترات طويلة قبل نقلها إل الرحم.

إن المضامين الاجتماعية والأخلاقية لمثل هذه التجارب أثارت الكثير من الجدل والخلاف، واعتبرت عملاً لا أخلاقياً ولا شرعياً واكتسبت النقطة المتعلقة بتحديد الوقت الذي تبدأ فيه حياة الإنسان أهمية كبيرة عند المهتمين بالمسائل الاجتماعية والأخلاقية، أي هل يعد الجنين في الأسبوع الأول والثاني من الحمل كائناً حياً أم مجرد كتلة لحمية لم تكتسب الروح والحياة.

والنقاط التي يمكن أن تثار تتضمن:

1 - إن الحياة مستمرة جيلاً بعد جيل وهي لا تنشأ بصورة جديدة أو غير مسبوقة عند شخص ما وهي بالتالي لا تبدأ للمرة الأولى في الكون عند إخصاب بويضة ما.

2 - إن حياة الإنسان ليست فريدة من نوعها بمعنى أن وجود مليارات من البشر على سطح الكوكب يختلف عن وجود فرد واحد وحيد يعود لنوع من أنواع الحياة، وهنا علينا ملاحظة أن حياة الإنسان وإن كانت ليست متفردة ولكنها حقاً فريدة على مستوى المشاعر والأحاسيس والنشأة والتفكير والخبرة والمواهب والبيئة، وأنه لا يوجد شخصان على وجه الأرض تتوحد فيهما هذه العوامل.

3 - إن الإخصاب يؤدي إلى ترسيخ الشخصية الوراثية للجنين وذلك باتحاد الجينات العائدة للأبوين، فهل يعد هذا الترسيخ للشخصية الوراثية هو بداية نشوء الحياة واستقلاليتها.

4 - لا تعد البويضة المخصبة (الجنين ذو الخلية الواحدة) شخصاً متفرداً أو جديداً فهو لا يملك على ضوء الأسس العامة أياً من الخصائص التي تربطه بالبشر، كذلك فهو لا يعد بناء على الأسس العامة العلمية فرداً بسبب إمكانية انقسامه لتكوين فردين (توأم)

وتوجد في الوقت الحاضر إمكانية ربط جنينين صغيرين معاً ببعضهما لتكوين حيوان واحد كامل.

5 - استطاع العلماء خلال الأطوار المبكرة للنمو الجنيني في الحيوانات من اقتطاع خلايا من الجنين من دون التأثير على النمو الطبيعي للجنين، وبذلك لا يمكن اعتبار خلايا الجنين المبكرة أجزاء متخصصة من كائن حي كامل. كما إن الخلايا المكونة للجنين لا تتميز عن تلك المكونة للمشيمة إلا بعد عدة أيام من الإخصاب.

إن حياة الإنسان على المستوى الخلوي والوراثي تتواجد قبل دخول وبعد الإخصاب بصورة مستمرة ودائمة ولكن لا يمكن وضع حدود واضحة المعالم لبدايتها فالفرد المتعدد الخلايا لا يظهر إلا بعد أسبوعين على الأقل من الإخصاب وعندها يكون غير متميز الأجزاء. أما الخصائص المحددة للإنسانية كمظاهر الوجه والتصرفات والوعي العقلي فلا تبدأ بالظهور إلا بعد ثمانية أسابيع من الإخصاب وقد تم افتراض خصائص الوعي الذاتي والحياة العقلية بهذه المدة، أي 8 أسابيع لأن اكتمال نضوج الجهاز العصبي للجنين يحدث بعد هذه المدة.

وفي عام 1979 نشر مقال في مجلة هاربرز بقلم هوراس جدسن(Horase Judson) يهاجم فيه علماء الأجنة (بيفس وإدواردز) متهماً إياهم بالبحث عن الشهرة. إن استخدام التلقيح الاصطناعي في تلقيح البويضة بحيامن تعود إلى رجل آخر غير الزوج تؤدي إلى اختلاط الأنساب وبالتالي إلى ضياع الحقوق مع ماتثيره هذه الأمور من اعتراضات ومشاكل أخلاقية. لذلك فهي محرمة قطعاً بالنسبة للدين الإسلامي الحنيف، ولكن استخدام السائل المنوي للزوج في تلقيح بويضة تؤخذ من مبيض زوجته أصبحت من الأمور الاعتيادية التي لا غبار عليها.

هذا وقد أثار حكم قضائي أطلقه قاض بولاية كاليفورنيا الجدل مجدداً حول التلقيح الاصطناعي في الولايات المتحدة، عندما اعتبر طفلة الأنابيب «فتاة دون أهل شرعيين» وقال محامي الدفاع أنه ليس هناك سابقة قانونية لوضع هذه الطفلة التي تدعى «جايسي بوزانكا» وبدأت هذه القضية عام 1994 عندما قرر رجل وامرأة كلاهما يعاني من العقم استخدام سائل وبويضة رجل وسيدة مجهولين وقبل ولادة طفلة الأنابيب جايسي بشهر واحد طلب الزوج «جون بوزانكا» الطلاق ورفض تحمل مسؤولية الطفلة. ورغم أن المنطق يرفض على الشخص الذي يتسبب بولادة طفل ما من يتحمل مسؤولية هذا

الطفل، وأصدر القاضي حكماً بعدم أهلية السيدة «بوزانكا» لتكون الأم الشرعية للطفل، وتعد هذه القضية الأولى من قضايا أطفال الأنابيب التي لاتكون فيها للجنين أي صلة عضوية بالأبوين أو بالسيدة المرضعة التي حملته، وقد أيدت المحكمة الزوج السابق بكونه غير ملزم بدفع أي نفقة.

هذا وقد أعلنت طائفة دينية ذات معتقدات غريبة تعرف بـ «الطائفة الرائيلية» (Raelian Movement) ومقرها في جنيف/ سويسرا أنها تنوي القيام بأول عملية استنسال بشري وذلك لأن استنسال الحمل «دوللي» كما يقولون كان تأكيداً لعقيدتهم القائلة بأن الحياة على الأرض هي من صنع أخصائيين في علم الوراثة جاءوا من عالم آخر، وتقترح الطائفة منذ بضعة أسابيع «على نشر خبر استنسال دوللي» عبر مواقعها في شبكة انترنت على الأهالي إنجاب طفل يحمل المزايا الوراثية ذاتها التي يحملها الأب والأم مقابل مئتي ألف دولار.

وأعلنت هذه الجماعة عن تأسيس شركة سميت بشركة المغامرة الشجاعة (Valiant Ventures) في جزر البهاماس في البحر الكاريبي: إن الاستنسال البشري سيكون حيثما تسود القبلية والعنصرية والتمييز العرقي، حيث إن التطابق الوراثي أكثر خطورة لأنه يفوق القبلية أو الانتماء أو التعصب الفئوي، كما أن أفراد النسخ المتطابقة ستكون من جنس واحد ذكور أو إناث، وهذا قد يعود بالفناء أو القضاء على النظام الاجتماعي لأنه سينتج من عزلة متطرفة تقود للانعزال وعدم الاختلاط بالجنس الآخر.

ومن الجوانب الاجتماعية المهمة الأخرى للاستنسال البشري هو ما ينشأ عن التوالد الذاتي من اضطراب العلاقات الأسرية والاجتماعية الناتجة من هذه الكائنات المكررة: بنوة أم أبوةأم أخوة.

وسبق للعالم د. روبرت سينشيمر (Robert Sinshiemer) أن أشار في العام 1968 إلى إمكانية نسخ الإنسان خلال 10 سنوات ومنذ ذلك الوقت أشار البعض من المهتمين بعلم الباراسايكولوجي «المواهب والقدرات فوق الحسية» إلى أن النسخ المتطابقة يمكنها أن تتصل ببعضها عن طريق التخاطر (نظراً لتطابق الترسيم العصبي «ذبذبات موجات الدماغ» لبعض التوائم) وعليه يمكن استنساخ نسخ لرواد الفضاء والمستكشفين تحت الماء على أعماق سحيقة والجواسيس الذين يعملون في أعماق أراضي العدو والذين يحتاجون إلى اتصالات استثنائية أثناء المهمات الخطيرة باستخدام التخاطر.

يؤدي الاستنسال البشري إلى معاناة القرين أو الطبيق من أزمة الهوية لأنه سيجد صعوبة في تمييز ذاته عن نسخته الأصلية وفقدانه لطابعه الوراثي المميز وفرديته Individuality واستقلاليته Autonomy وموضوعيته (Objectification) وصلة قرابته (Kinship) ويشكل مظهر الإنسان إحدى آيات تفرده عن سواه وهي التي تولد الإحساس الفريد والمميز بالذات الإنسانية، ويسهم أشد الإسهام في ترسيخ الشعور بقيمة الفرد. والسؤال الذي قد يرد إلى الذهن هو هل يمكن اعتبار الاستنسال البشري نوعاً من عدم الفناء الطبيعي؟ وإذا كان كل من الشخص الأصيل (واهب النواة) والنسخة عنه (القرين أو الطبيق) سيواجه موتاً جسدياً محتوماً فإن النسخة لن تكون سوى تركيباً وراثياً متماثلاً في جسد جديد، وحتى هذا التماثل الوراثي سيكون عرضة للتغيير نتيجة الطفرات التلقائية، فالخلود الحقيقي هو خلود الدنا (DNA) المتسلسل للفرد وذلك باستبدال النسخ المهترئة منه بنسخ جديدة وإلى الأبد.

إن السؤال الأكثر أهمية يتمثل في من الذي سيوافق عن الجنين (القرين) ذاته وليس (بالنيابة) على إجراء عملية النسخ. إن العلاقة بين القرين «النسخة» وأصلها أو بينها وبين متبنيها لن تكون إلا علاقة يشوبها التنافر والغرابة وحتى بافتراض تطابق الظروف والعوامل البيئية والاجتماعية لكل من النسخة والأصل فإن القرين لن يقدم أي إضافة بما سبق وأن قدمه «الأصل» والعلاقة بين «القرين» و «الأصل» لن تحددها الظروف البيئية والاجتماعية والنفسية التي سينشأ عليها الطفل المستنسل حسب بل تتحدد أيضاً بالمواصفات الشكلية والجمالية والسلوكية. إن مجموعة معقدة من المشاعر والعوامل الكامنة قد تولد الرغبة عند شخص ما لإنتاج نسخة عن ذاته كالرغبة الجامحة في تأمين استمرارية الحياة والأفكار الهذيانية والميول الهستيرية والرغبة في تأكيد الذات والتفاخر والتمايز الاجتماعي والنرجسية «حب الذات» وأخيراً استخدام «القرين» كمصدر لقطع الغيار البشرية كبنك للدم والأنسجة والخلايا، وقد تكون الرغبة في الاستنسال هو محاولة الشخص في إيجاد نسخ له بأكثر من قناع اجتماعي كمحاولة للتنفيس عن رغباته المكبوتة فقد يكون فاجراً في أعماقه وقديساً في حياته العائلية والاجتماعية.

وكما أن للاستنسال البشري معارضيه، فإن هناك مؤيدين له، وقد وضع هؤلاء قائمة طويلة من التطبيقات المحتملة التي قد ينجذب إليها الكثيرون في المستقبل القريب والتي تشمل:

1 - إمكانية الحصول على مجتمع كبيرة من البشر المتطابقين وراثياً والمنتجين على أساس وراثي محدد ومميز لتشكيل شعب أو أمة مختارة على أسس انتقائية أو لتشكيل جيوش من العسكريين المحترفين، وكذلك لغرض إجراء الدراسات العلمية.

2 - استنساخ المواهب والعظماء وممن يتمتعون بقدرات استثنائية بهدف تحسين النوع والحياة.

3 - التحكم بجنس الأطفال أو نسب الذكور والإناث في المجتمع.

4 - إنجاب أطفال حسب الطلب ممن يمتلكون طابعاً وراثياً مميزاً (نسخ من الزوج أو الزوجة أو أحد الأقارب المتوفين).

5 - إلغاء مشكلة العقم بإيجاد حل بديل للحصول على طفل للزوجين العقيمين.

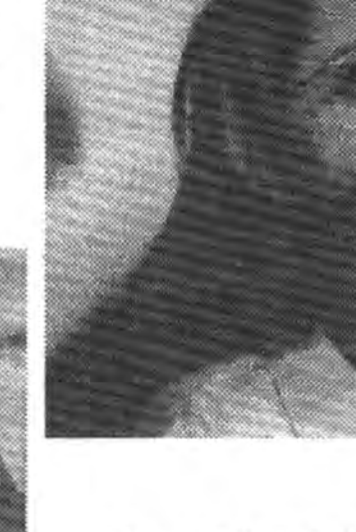
6 - إنتاج نسخة جينية من كل فرد، تجمد وتحفظ لوقت الحاجة كمصدر لتزويده بالأعضاء بدلاً من الأعضاء التالفة.

7 - نسخ الأصحاء لتلافي مخاطر الأمراض الوراثية الكامنة في «يانصيب» التراكيب الجينية.

إن الإنسان هو الوحيد من بين الكائنات الحية الأخرى له القدرة على قهر الطبيعة. ففي الثلاثة مليارات سنة الماضية، عاش على وجه الأرض أكثر من مئة مليون نوع من الكائنات الحية والتي انقرضت فيما بعد ولم يبقى منها سوى مليوني نوع والعديد من هذه الأنواع في طورها للانقراض، والمسألة مسألة وقت ليس إلا، والإنسان هو النوع الوحيد - من بين المليوني نوع ـ الذي يتمتع بالقدرة على البقاء وعلي القيام بعملية تحسين النوع البشري بنفسه. فهل يمكن اعتبار الاستنسال البشري هو الوسيلة الموعودة والأمل الذي راود الإنسان لتحسين النوع البشري.

إن التكنولوجيا بحد ذاتها تحتل موقعاً حيادياً بين الخير والشر، والأشرار من الناس هم الذين يستعملونها لأغراضهم الشريرة، بينما يمكن أن يستخدمها الأخيار لأغراض الخير. ويبقى السؤال هل يتم استنسال الآلاف من الطاغية (بول بوت) المسؤول عن مقتل أكثر من مليوني شخص في كمبوديا، أو استنسال (الأم تيريزا) التي سميت بنصيرة الفقراء أو استنسال الجمال والموهبة كاستنسال الممثلة جيليان أندرسون (الشكل 8 - 2).

جليان أندرسون بطلة مسلسل
(ملفات أكس) ←





القاتل المبتسم بول بوت →

الأم تيريزا
←



الشكل (8 - 2): «بول بوت» أم «الأم تيريزا» أم الجميلة جيليان أندرسون خيارات الاستنسال البشري

8 - 2 الاستنسال البشري والدين:

يعد الاستنسال البشري والاستنسال البايولوجي من النوازل المتجددة والتي لا يوجد لها سوابق أو نظائر يمكن الياس عليها، ولكن يبقى الأصل في الإفتاء الشرعي هو المصلحة والفائدة والمنفعة. وفي الحقيقة فإن تقنية الاستنسال تختلف بشكل بيّن وواضح تماماً عن بقية التقنيات الأخرى (طفل الأنابيب بالحقن المجهري I.C.S.I والتلقيح الاصطناعي داخل الرحم I.U.I وعمية استكشاف الخصيتين واستخلاص الحيوانات المنوية أو الخلايا المولدة لها مع الحقن المجهري للبويضة Tese + ICSI)، حيث لا يمكن عد هذه التقنيات سوابق يمكن الاعتماد عليها في الإفتاء الشرعي. إن النقطة الأساسية التي يجب التوقف عندها هو تحديد مفهوم الاستنسال البشري هل هو خلق (إيجاد شيء من شيء) أم أبداع (إيجاد شيء من لا شيء) والأبداع هو الذي يختص به الله جل وعلى حسب ما يرى د. محمد محروس المدرس الأعظمي الذي يحكم بجواز الاستنسال البايولوجي نظراً لعدم وجود دليل على الحرمة ولأن الأصل في الأفعال هو الإباحة ويشير د. حسين الشافعي أستاذ الفلسفة الإسلامية في جامعة القاهرة إلى أن الاستنسال البشري حتى لو تم تطبيقه فإنه لن يشكل خطراً على عقيدة المسلم في اعتقاده بتفرد الله تعالى بالخلق بمعناه الديني الاعتقادي وذلك لانتفاء صفة الإبداع (خلق شيء من العدم)ولا خلقاً للحياة والنفوس. ﴿يا أيها الناس ضرب مثل فاستمعوا له إن الذين تدعون من دون الله لن يخلقوا ذباباً ولو اجتمعوا له وأن يسلبهم الذباب شيئاً لا يستنقذوه منه ضعف الطالب والمطلوب﴾ (سورة الحج/ الآية 73).

فالاستنسال هو عملية اقتراض خلية (إن صح المعنى) من كائن حي واستخلاص نواتها فيزود بها بويضة أنثى من نفس النوع بعد تفريغها من نواتها الأصلية، ثم يتم إيداعها رحماً حياً فيأتي الوليد ـ بعد إتمام مدة الحمل مشابهاً وتوأماً للمصدر الذي أخذت منه النواة.

أما بالنسبة للأمهات المرضعات أو النساء اللواتي يؤجرن أرحامهن لتقبل حيامن الأغراب أو البيوض الملقحة من نساء ورجال آخرين أو يتبرعن ببيوضهن فإن الأرحام في

الشرع الإسلامي مصونة محرمة إلا بالنسبة لأزواجهن الشرعيين ولا يجيز الشرع للمرأة أن تتبرع بأجهزتها التناسلية أو تؤجرها أو بعضاً منها لما له من مساس بالكرامة الإنسانية.

وقد يطرح تساؤل آخر : أمن الخير للبشرية أن تنزع إلى تثبيت خصائص معينة وتكرارها بما يفضي إلى التماثل والنمطية. أم الخير لها وجود الفروق الفردية والتنوع الثري في الخصائص الإنسانية والتي هي من حكمة الخالق - سبحانه ﴿ **ومن آياته خلق السموات والأرض واختلاف ألسنتكم وألوانكم إن في ذلك لآيات للعالمين**﴾ [سورة الروم 22] .

إن الاستنسال البشري سوف يؤدي إلى تغيير العديد من المفاهيم للعلاقات الأسرية والاجتماعية فما هي العلاقة التي سوف تربط القرين المستنسل بالأصل؟ إن هذا القرين أو الطبيق أو التوأم هو شقيق في واقع الحال لمعطي أو واهب الخلية وذلك لأن المادة الوراثية بأكملها لكل من القرين (أو النسخة) وواهب الخلية يقود بالأصل إلى ذات الأم والأب وهي حالة مماثلة لإنجابها توأمين متماثلين ولهم ذات المادة الوراثية ولكن التساؤل هنا سيكون حول مدى أحقية القرين أو النسخة الجديدة في استحقاق الميراث وحرمة التناكح مع المحارم للأصيل ووجوب التكافل وغيرها من الأمور الشرعية ولنضرب مثلاً هو وجود أب غني وله ولدين فقط هما وريثاه الوحيدين وتمكن أحدهما من دفع التكاليف الباهظة لعملية الاستنسال واستنسل ثلاث نسخ منه ولم يتمكن الآخر أو يرغب من أن يستنسل ذاته لعوامل أخلاقية أو اقتصادية فهل يحصل الابن الثاني الذي استنسل نفسه على أربعة أخماس الميراث «لواهب الخلية حق الوصاية والولاية المعنوية على النسخ الصغيرة العمر من نسخه» ولمن يكون حق الوصاية والولاية على الأطفال القرائن في حالة الموت المبكر لواهب الخلية. وعندما يكبر هؤلاء القرائن هل يطالبون بحق الزواج من ذات زوجة (الأصيل) أي واهب الخلية باعتبار أنهم ذات الشخص سواء توفي أو بقي على قيد الحياة وهناك مشكلة أخرى هي في حالة تبرع امرأة ما بأحد خلاياها لاستنسالها ومن ثم تم زرع الجنين الناتج من عملية الاستنسال في رحمها فهي أي القرينة الأنثى شقيقة أو توأم للأصيلة واهبة الخلية ولكنها أيضاً ابنة لها في ذات الوقت بحكم حملها للقرينة في رحمها وولادتها لها وإرضاعها لها فكيف تجتمع الأخوة والبنوة معاً وهل هناك عشوائية واتجاه نحو التفكك الاجتماعي أكثر مما يتطلب وضع التشريعات الدينية والقانونية التي

تنظم العلاقـات بين أفراد المجـتمع تجاه هذا التـحدي الجديد والذي قـد يحاول فـيه بعض العلماء مـن ضعاف النفـوس أن يتحـدوا قدرة الخالق البـارىء المصوّر وهم عـاجزون عن ذلك : ﴿**أم جعلوا شركاء خلقوا كخلقه فتشابه الخلق عليهم**﴾ [الرعد 116].

إن الخلق لله عز وجل فقط لا غير أما التلاعب الـوراثي والتكوين فيستطيعه الإنسان باستخدام ما خلقه الله من وسائل فالإنسـان لم يخلق البويضة أو الحيمن أو الكروموسوم وقد استطـاع الإنسان أن يخصب البويضـة في أنابيب الاختبار وأن يسـتنسل المادة الوراثية فيـغيـر من بعض صـفـاتـهـا وأن يكوّن نسـخـة اصطناعـيـة من بـعض الجـينات وحـتى الكروموسـوم ولكن كل ذلك تم اعتماداً على مـواد أساس ووحدات بنائية خلقـها الله أو اعتمـاداً على قالب أو شفرات وراثيـة من صنع الله فسبـحان الله الذي يَخلقُ ولا يُخلَقُ. أما الإنسـان الذي يجنح إلى تشـويه هذه الصورة الجـميلة المنظمـة ويعبث بهـا باستـخدام مقصـاته الجزيئية ويعيدها إلى عـشوائية اللاستقـرار والعبثية فإن الله عـز وجل يخاطبه في مـحكم كتـابه : ﴿**يا أيها الإنسـان ما غرك بربك الكريم. الذي خلقك فسواك فعدلك. في أي صورة ما شاء ركبك**﴾ [سورة الانفطار : الآيات 6 - 8].

المصادر العربيــة

ـ إسلام ، أحمد . (1988) . لغة الكيمياء عند الكائنات الحية . سلسلة عالم المعرفة . المجلس الوطني للثقافة والفنون والآداب .

ـ الأشقر ، محمد سلمان عبد الله . (1997) . الاستنساخ في ميزان الشريعة الإسلامية . الدورة العاشرة لمجمع الفقه الإسلامي في جدة .

ـ الجابري ، أحمد عمرو . (1998) . تعيين جنس الجنين والممارسات الأخلاقية والطبية والاجتماعية . دار البشير للنشر والتوزيع .

ـ الجلبي ، قصي عبد القادر . (1991) . الأحماض النووية . جامعة الموصل . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . مطبعة جامعة الموصل .

ـ الربيعي ، محمد . (1986) . الوراثة والإنسان (أساسيات الوراثة البشرية والطبية) . سلسلة عالم المعرفة (100) . المجلس الوطني للثقافة والفنون والآداب .

ـ الزعاك ، علي عبد الرحمن . (1989) . استنساخ البشر : اعتبارات أخلاقية وحيوية في الهندسة الوراثية . مجلة آفاق عربية (السنة الرابعة عشر) صفحة : 140 - 143 .

ـ الزعاك ، علي عبد الرحمن . (1997) . عصر الاستنساخ . مجلة علوم العدد : 92 . صفحة 22 .

ـ السعيد ، عبد الله عبد الرزاق . (1997) . القنبلة الجينية (الوراثية) واستنساخ النعجتين بوللي ودوللي والثور الأمريكي . مجلة الدواء العربي . العدد 2 السنة 16 . صفحة 151 .

ـ الشافعي ، حسن . (1997) . الاستنساخ البشري من وجهة نظر شرعية . مجلة العربي العدد : 664 صفحة 631 ـ 141 .

ـ العبيلي ، أياد محمد علي . (1999) . معالجة الأمراض وبعث الحيوية في الخلايا باستعمال الإنزيمات ـ إنزيم التيلوميراز . مجلة علوم . العدد (105 و 106) صفحة 68-69 .

ـ العبيلي ، أياد محمد علي . (1999) . الهندسة الوراثية والصدمة الحضارية : الأفاق

والمخاطر من المعالجة الوراثية إلى القنبلة الجينية . مجلة علوم العدد (102) آذار _ نيسان (1999) صفحة : 43 - 44 .

ـ العبيدي ، أياد محمد علي (2000) . الاستنساخ البشري وهندسة الإنسان وراثياً الأوهام والحقائق . مجلة علوم . العدد (107) صفحة 36 .

ـ العبيدي ، أياد محمد علي . (1999) . هندسة التحوير الجيني وإنتاج الفئران عبر الوراثية العملاقة . ورشة العمل عن الاتجاهات الحديثة لاستخدام النظائر المشعة والإشعاع في التكنولوجيا الحيوية القاهرة 27 - 30 نوفمبر 1999 .

ـ العبيدي أياد محمد علي . (2000) . هندسة التحوير الجيني والاستنساخ البايولوجي . مجلة علوم . العدد (108) ـ آذار ـ نيسان صفحة 42 - 43 .

ـ العذاري ـ عدنان حسن محمد (1986) . أساسيات في الوراثة . جامعة الموصل وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .

ـ الكريّم ، صالح عبد العزيز . (1997) . الاستنساخ : تقنية فوائد ومخاطر ، كلية العلوم . جامعة الملك عبد العزيز .

ـ الكويتي ، عبد الله صادق . (1985) . الهندسة الوراثية . الجزء الثاني ، الموسوعة الصغيرة. العدد 158 . دار الحرية للطباعة .

ـ العلمي ، رياض رمضان . (1988) . الدواء من فجر التاريخ إلى اليوم . سلسلة كتب عالم المعرفة . المجلس الوطني للثقافة والفنون والآداب .

ـ الموصلي ، سامي أحمد (2000) الاستنساخ البشري بين خيال العلماء وواقع الأطباء . مجلة الفتح . السنة الأولى عدد خاص صفحة 32 - 37 .

ـ النعيمي ، فادية . الاستنساخ : تفوق بايولوجي جديد يثير تساؤلات خطيرة . (مقالة مترجمة) . مجلة ألف باء . العدد (1489) . 9 / نيسان / 1997 .

ـ برنوطي ، رمزي . (1997) الاستنساخ هل يكون الحل لبعض أسباب العقم ؟ مجلة الطبيب العراقية ـ العدد الأول ـ تموز 1997 .

- جاردنر ، أ ، ج و د ـ ب سنســتاد . (1984) . مبـادىء علـم الوراثـة . (مـترجم) . الـدار العربية للنشر والتوزيع .

- جلبي ، خالص . (1997) هل يستنسخ البشر . مجلـة العربـي . العـدد (364) . صفحـة 71 - 75 .

- حلمي ، مصطفى محمود . (1997) . آخر قنـابل هندسـة التكـاثر . مجلـة العربـي العـدد 364 . صفحة 65 ـ 70 .

- حماش ، محمود حياوي . (1997) . أهمية التطورات الحديثة في الاستنساخ الوراثـي . مجلـة الطبيب العراقية ـ العدد الأول ـ تموز 1997 .

- خلـف ، ازور نعمـان . (1986) . التقنيـة الحيويـة والهندسـة الوراثيـة ـ موسـوعة علـوم سلسلة كتاب الثقافة العلمية . العدد 70 وزارة الثقافة والإعلام .

- دور روبرتس ، اي . م و أوليفـر، ج ورايـت ، اي ، ف . (1992) . جينـات الخانـة المثليـة وخطة التكون الجسدي لدى الفقريات . مجلة العلوم . المجلد 8 . العدد 9 .

- رستنك ، د . ل . (1995) . اتجاهات في البايولوجيا : لماذا نشيخ . مجلة العلوم . المجلد 11 . العددان 8 و 9 .

- رورفيـك ، د . م . في مرآتـه : استنسـاخ الإنسـان . ترجمـة بعنـوان "تناسـخ الأجسـاد" ، (1978) ديكران جيجنيان . دار الحكمة للطباعة والنشر .

- زاوية علوم وتكنولوجيا . (1999) . وبدأ عهد زراعة الراس في الإنسان / جريـدة الـرأي الأردنية العدد 10586 - 3 أيلول .

- سعيد ، منى . (2000) تقنيـة الجينـات . قابليـة التعلـم حتـى المـوت . مجلـة ألـف بـاء ـ صفحة 31 .

- سعيد ، منى . (1997) . بحوث الجينات (أهم اكتشاف علمي لهذا القـرن) مقالـة علميـة مترجمة . مجلة ألف باء العدد 1488 .

- سلطان، سندس هادي . (1987) . استخلاص المادة الوراثيـة (الحـامض النـووي) لموميـاء صفحة الإنسان والمعرفة . جريدة الثورة الصادرة يوم 8 / 7 / 1987 .

- سليمان ، سعد هادي . (1986) . علم الوراثة سلاح لإعادة الشباب . مجلة العلم والمستقبل . العدد 1 . وزارة الثقافة والإعلام . دائرة الإعلام الداخلي .
- صالح عبد المحسن . (1979) . ما يفرّقه الإنسان تجّمعه الحياة . مجلة العربي العدد 782 . صفحة 114 - 120 .
- عامر ، مدحت . (1997) . الإخصاب وشبح الاستنساخ البشري . مجلة طبيبك الخاص . العدد 543 . دار الهلال .
- عبد الله ، وسيم . (1985) . أنظمة التحكم بوساطة الحيوانات . مجلة العربي . العدد (613) مارس آذار 1985 .
- عبود ، خزعل . (1988) . لماذا التلقيح الاصطناعي في الأبقار . مقالة في جريدة الثورة الصادرة يوم 8 / 10 / 1988 .
- عطا الله ، عبد الفتاح محمد . (1997) . الاستنساخ مرة أخرى . مجلة العربي . العدد (764) . صفحة : 116 ـ 119 .
- علوان ، سامي فاضل . (1993) . نقل الأجنة في الحيوانات المزرعية . نشرة التقنيات الحياتية (أخبار ومعلومات) . وحدة التقنيات الحياتية كلية التربية / جامعة الموصل . العدد (4) نيسان 1993 .
- عماش ، هدى صالح مهدي ، العبيدي ، عبد الحميد ؛ المدرس ، محمد محروس ؛ محمود ، ضاري خليل ؛ الفخري ، عوني . (1999) . الاستنساخ البشري ... الطب والعلوم ... الشريعة والقانون . بيت الحكمة ، ساسلة المائدة الحرة رقم 44 .
- عماش ، هدى صالح مهدي . (1988) . الهندسة الوراثية تقنية جديدة أم خطر كوني . موسوعة علوم . سلسلة كتاب الثقافة العلمية العدد 20 .
- فتحي ، حسن . (1997) . الاستنساخ بين طموح العلم ومخاوف البشر / ملف العدد مجلة علوم وتكنولوجيا العدد (41) . صفحة 19 - 29 .
- فلاندر ، هـ . و ، لوبون ، هـ ودورهان ، ن . و . (1997) . حيوانات محورة جينياً كمصانع للأدوية . مجلة العلوم . المجلد 13 العدد (4) . صفحة 34 ـ 39 .

ـ قره داغي ، ك . (1978) . الإنسان : آخر المعلومات العلمية عنه . الموسوعة الصغيرة (20) . منشورات وزارة الثقافة والإعلام والفنون .

ـ كيفلس ، دانييل . (1993) . التاريخ العاصف لعلم وراثة الإنسان / ترجمة الدكتور أحمد مستجير ، المكتبة الأكاديمية .

ـ محمد ، محمود الحاج قاسم . (1999) . الاستنسال (الاستنساخ) بين العلم والدين . مكتبة الجيل العربي ، الموصل .

ـ معارج ، محمد عبد المحسن . (1999) . مقدمة في الهندسة الوراثية . جامعة دمشق .

ـ هيوار ، ايفلين . (1977) . علم الأنسجة لطلبة الطب البشري . ترجمة د . عبد الفتاح محمد طيرة . مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر .

ـ ويلسون ، ج . ب و موريسون ، ج . ج . (1978) . علم الخلية . ترجمة د . جبرائيل برصوم عزيز ، السيد طلال فتحي العزاوي ، السيد يحيى ذنون اليونس . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة الموصل .

ـ ويلموت ، أ . (1999) . الاستنساخ لأغراض طبية . مجلة علوم المجلد (15) ـ العدد (5) ـ مايو ـ أيار 1999 ـ صفحة 34 ـ 39 .

ـ يوسف ، فيصل . (1997) . الكشف عن تجارب لحفز خلايا بشرية على النمو في المختبرات (مقالة في ملحق الواحة الأسبوعي) جريدة الاتحاد الإماراتية الصادرة يوم الخميس 7 أغسطس (آب) 1997 .

REFERENCES

- A -

1 - Aitken, R.J and Irvine, D. S. (1996). Fertilization without Sperm. Nature. 379 : 493 - 495.

2 - Annas, G. J. (1998). Why we should ban Human Cloning. N. Engl. J. Med 339 : 122 - 125.

3 - Awguleqitsch, A. and Jacobs, D. (1992). Deformed autoregulatory element from Drosophila functions in a conserved manner in transgenic mice - Nature. 358 : 341 - 346.

- B -

4 - Barinaga, M.; Yamonoto, G.; Rivier, C.; Vale, W.; Evans, R. and Rosenfeld, M, G. (1983). Transcriptional regulation of growth hormone gene expression by growth hormone - releasing factor. Nature. 306 : 84 - 85.

5 - Begley, S. (1997). Can we clone humans? Newsweek, March 10, pp. 53 - 60.

6 - Bensaude, O.; Babient, C.; Morange, M - and Jacob, F. (1983). Heat shock proteins. First major products of zygotic gene activity in mouse embryo Nature. 305 : 331 - 332.

7 - Borrebaeck, C. A and Hagan, I. (1992) Electromanipulation in Hybridoma technology : A laboratory manual. Stockton press.

8 - Bray, D. (1979). Cytochalasin action. Nature. 282 : 673.

9 - Brinster, R. L.; Chen, H. Y. and Trumbauer, M. E. (1981). Mouse Oocytes transcribe injected Xenopus 5S RNA gene. Science. 211 : 396 - 398.

10 - Brinster, R. L.; Chen, H. Y;Trumbauer, M. E.; Yagle, M. K. and Palmiter, R. D. (1985). Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. proc. Natl. Acad. Sci, USA. 82 : 4438 - 4442.

11 - Brinster, R. L., Ritchie, K. A.; Hammer, R. E.; O'Brien, R. L.; Arp, B. and Storb, V. (1983). Expression of a microinjected immunoglobulin gene in the Spleen of transgenic mice. Nature. 306 : 332 - 336.

12 - Buhler, T. A.; Bruye're, Th.; Went, D. F.; Stranzinger, G. and Burki, k. (1990). Rabbit β - Casein Promoter directs Secretion of human interleukin - 2 in to the milk of Transgenic rabbits. Biotechnol. 8 : 140 - 143.

13 - Butler, D. (1997). Roslin patents Come under the spotlight. Nature. 387 : 217.

- C -

14 - Campbell, K. H. S.; McWhir, J.; Ritchie, W. A. and Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a Cultured Cell line. Nature. 380 : 64 - 66.

15 - Campbell, K. H. S.; Mc Whir, J., Ritchie, W. A and Wilmute, I. (1996). Implication of cloning. Nature. 380 : 383.

16 - Capecchi, M. R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. Science. 244 : 1288 - 1292.

17 - Chang, M. C. (1959). Fertilization of Rabbit Ova in vitro. Nature. 184: 466 - 467.

18 - Cosmic, M. and Inam, S. (1997). Implications of Dolly the clone. Saudi Medical. Journal. 18 : 543 - 454.

19 - Costantini, F and Lacy, E. (1981). Introduction of a rabbit β - globin gene in to the mouse germ line. Nature. 294 : 92 - 94.

20 - Coupland, D. (1997) - Will there ever be anather you. (Aspecial report on cloning). Time, March 10, 1997.

- D -

21 - De Mayo, F. J.; Mizoguchi, H.; Dukelow, W. R. (1980). Fertilization of Squirrel monkey and Hamster Ova in the Rabbit Oviduct. (Xenogenous Ferrilization). Science. 208 : 1468 - 1469.

22 - Driever, W. and Fishman, M. C. (1996). The Zebrafish : Heritable Disorders in Transparent embryos. J. clin. Invest. 97 : 1788 - 1794.

- E -

23 - EITORIAL. (1996). What to do with Spare embryos. The Lancet. Vol. 347, No 9007, April 1996.

24- EDITORIAL. (Short - circuit to be avoided by bioethics committees. Nature. 387: 321.

25- Edwards, R.G. (1971). Problems of Artificial fertilization. Nature. 233: 23 - 25.

26- Evans, M.J. and Kaufman, M.H. (1981). Establisment in culture of Pluripotential cells form mouse embryos. Nature. 292: 154 - 156.

- F -

27- Frankham, R. and Gilling, M.R. (1984). Molecular biology and It's application to domestic animals. In:

Animal genetic resource cryogenic Storage of germplasm and Molecular engineering, FAO 44/2 Rome.

- G -

28- Gilbert, S.F. (1991). Developmental biology, Third Edition, Sinauer publiaction.

29- Glover, D.M. (1984). Gene cloning: The mechanics of DNA Manipulation. Chapman and Hall.

30 - Godke, R.A. and Rorie, R.W. (1993). Embryo microsurgery for. Large animals. pp. 155 - 163. In: Gamete and embryo micromanipulation in human reproduction., Edited by: Fishel, S. and. Symonds, M. Edward Arnold publication.

31 - Goodell, R. (1980). When they were New: Rocketry, Fission and cloning., Sciquest. 53 : 29.

32 - Gurdon, J.B.; Lane, C.D. Woodland, H.R. and Marbaix, G. (1971). USe of froy eggs and Oocytes for the Study of Messenger RNA and translation in Living cells. Nature, 233 : 177 - 182.

-H -

33 - Hammer, R.E.; Pursel, V.G; Rexroadj, C.E.; walit, R.; Bolt D.J.; Ebert, K.M .; Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. (1985). Production of transgenic rabbits. Nature. 315 : 63 - 66.

34 - Harbers, K.; Jahner, D. and Jaenisch, R. (1981). Microinjection of cloned retroviral genomes into mouse zygotes : Integration and expression in the animal. Nature. 293 : 540 - 542.

35 - Harris, A.M.; Whittingham, D.G. and Wilson, L. (1982). cytoplasmic control of Preimplantation development in Vitro in the mouse. Nature. 299 : 460 - 462.

36 - Hogan, B. (1983). Enhancers, Chromosome Position. effects, and transgenic mice. Nathre. 294 : 9 -10.

37 - Holden, C. (1997). Calf cloned form bovine cell Line. Science. 277 : 903.

38 - Hsu, Y.C. and Gonda, M.A. (1980). Monozygotic Twin formation in mouse embryos in Vitro. Science. 209 : 605 - 606.

39 - Hunlich, T.A; Trotnow, S. and Kniewald, T.(1984). In Vitro Fertilization and Embryotransfer implications for genetic engineering. In: Genetic Manipulation: Impact on man and Society; Arber, W, etal. (Edit). PP.239 - 245. The ICSU Press.

- J -

40 - Jaenisch, R. (1988). Transgenic animals. Science. 240 : 1468 - 1474.

- K-

41 - Kahn, A.(1997). clone mammals.... clone man? Nature. 386 : 119.

42 - Kassirer, J. P and Rosenhal, N.A. (1998). Should human cloning research be off limits. N Engl J Med. 338 (13). 905 - 906.

43 - Kobayashi, Y.; Santulli, R.; wright, K.H. and Wallach, E.E.(1981). Science 213 : 1127 - 1128.

44 - Kolata, G. (1983). In Vitro Fertilization Goes Commercial. Science. 221: 1160 - 1162.

45 - Kubiak, J.Z. and Tarkowski, A.K. (1985). Electro Fusion of mouse blastomeres. Exp, cell. Res. 157 : 561 - 566.

- L -

46 - Leder, P.; Hansen, J.N; Konkel, D.; Leder, A.; Nishioka, Y. and Talkington, C. (1980). Mouse globin System: A. Functional and evolutionary analysis. Science. 209 : 1336 - 1337.

47 - Lewis, J.; Yang, B.; Detloff, P. and Smithies, O. (1996). J. clin. Invest. 97 : 3 - 5.

48 - Lin, T.P.; Florence, J. and OH, J.O. (1973).

cell fusion induced by a virus within the Zona pellucida of Mouse eggs. Nature. 242 : 47 - 49.

- M -

49 - Macllwain, C. (1993). Cloning of human embros draws fire from Critics. Nature. 365 : 778.

50 - Majzoub, J.A. and Maglia, L. (1996). Molecular medicine : Knockout Mice. N. Engl.J. Med. 334 : 904 - 907.

51 - Marx, J.L. (1981). Three Mice "cloned" in Switzerland. Science. 211 : 375 - 376.

52 - Marx, J.L. (1981). More Progress on Gene transfer Science. 213 : 996 - 997.

53 - Marshall, E. (1997). Varmus grilled over breach of embryo research ban. science. 276 : 1963.

54 - Marshall, E. (1997). The mouse that Prompted a roar. Science. 277 : 24 - 25.

55 - Marth, J.D. (1996). Recent advances in gene mutagenesis by site - directed Recombination. J. Clin. Invest. 97 : 1999 - 2001.

56 - McGrath, J. and Solter, D. (1983). Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion Science. 220 : 1300 - 1302.

57 - McGrath, J. and Solter, D. (1983). Nuclear transplantation in mouse embryos. J. Exp. Zool. 228 : 355 - 362.

58 - McGrath, J. and Solter, D. (1984). Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. Science. 226 : 1317 - 1319.

59 - Modlinski, J.A. (1978). Transfer of embryonic nuclei to fertilised mouse eggs and developmwnt of tetraploid blastocysts. Nature. 273 : 466 - 467.

60 - Modlinski, J.A. (1981). The fate of inner cell mass and trophectoderm nuclie transplanted to fertilized mouse eggs. Nature. 292 : 342 - 343.

61 - Mullins,J,J and Mullins, L.J. (1993. Transgenesis in Nonmurin Species. Hypertension. 22(4). 630 - 633.

62 - Mullins,L,J and Mullins, J.J. (1996. Transgenesis in the Rat and Larger.J.Clin Invest. 97: 1557 - 1560.

- N -

63 - Nagel, R.L. (1998). A Knockout of a transgenic mouse - Animal models of Sickle cell anemia. N. Engl. J. Med. 339: 194 - 195.

64 - Nagy, A; Gocza, E.; Diaz, E. M.; Prideaux, V.R.; Ivanyi. E.; Markkula,M and Rossant, J. (1990). Embryonic stem cells alone are able to support fatal development in the mouse. Development. 110 : 815 - 821.

65 - Nagy, A and Rossant, J. (1996). Perspectives series: Molecular Medicine in genetically engineered Animals - Anslysis of phenotype without Germ line transmission, J. clin. Invest. 97 : 1360 - 1365.

66 - Nagy, A.; Rossant, J; Nagy, R.; Newerly, W.A. and Roder,J.C. (1993). Derivation of completely cell culture - derived mice. from early - Passage embryonic Stem cells proc. Nati. Acad. Sci. USA. 90: 8424 - 8428.

67 - Norman, C. (1983). Clerics Urge Ban on Altering Germline cells. Science. 220 : 1360 - 1361.

- O -

68 - Orban, P.C; Chui, D. and Marth, J. D. (1992). Tissue - and Site - Specific DNA recombination in transgenic mice. Proc. Nati. Acad. sci, USA PP. 6861 - 6865.

- P -

69 - Palmiter, R.D. and Brinster, R.I. (1984). Making a bigger mouse, In: Genetic manipulation impact on man and Society, Arber, wW. et al. ICSU Press.

70 - Palmiter, R.D; Brinster, R.L; Hammer, R.E; Trumbaur, M.E; Rosenfeld, M.G; Brinberg, M.C, and Evans, R.M. (1982). Dramatic growth of Mice that develop from eggs microinjected with metallothionein grwth hormone fusion genes. Nature. 300: 611 - 615.

71 - Petri, W. (1982). Transgenic Organisms and development, Nature 299: 399 - 400.

72 - Pursel, V.G.; Pinkert, C.A.; Miller, K.F.; Bolt, D.J.; Campbell, R.G.; Palmiter, R.D.; Brinster, R.L. and Hammer, R. E. (1989). Genetic Engineering of Livestock. Science. 244 : 1281 - 1288.

- R -

73 - Raven,J and Johnson,B. (1992). Biology, 3Ed Int. Mosby Year book.

74 - Rich, V. (1978). Study begins on baby mammoth - Nature. 273 : 483.

75 - Robertson, J.A. (1996). Genetic selection of offspring characteristics. Boston univ Law. Rev. 76 : 421 - 482.

76 - Robertson, J.A. (1998). Liberty, Identity and Human cloning. Texas Law Review Association 76. 1371 - 1456.

77 - Robertson, J.A. (1998). Human Cloning and the Challenge of Regulation. N Engl J Med. 339 (2) 119 - 122.

78 - Rossant, J. (1976). Postimplantation development of blastomeres isolated form 4 and 8 - cell mouse eggs. J. Embryol. exp. Morph. 36: 283 - 290.

79 - Rowson, L.E.A.(1971). Egg transfer in domestic animals. Nature. 233: 379 - 381.

80 - Ruddle, F.H. (1981). A new era in mammalian gene mapping: somatic cell genetics and recombinant DNA Methodologies Nature. 294: 115 - 119.

- S -

81 - Schelletens, H. (1993). DNA Makers: Architects of life. Natue and Techniek Publication.

82 - Schnieke, A.S.; Kind, A.J.; Ritchie, W.A.; Mycock, K.; Scott, A.R.; Ritchie, M.; wilmut, I; colman, A. and Cambell, K.H.S. (1997). Human Factor IX Transgenic Sheep produced by transfer of nuclei form transfected Fetal Fibroblasts. Science. 278 : 2130 - 2133.

83 - Seidel, G.E. (1981). Superovulation and Embryo transfer in Cattle. Science. 211 : 351 - 357.

84 - Seno, T. and Sato, S. (1959). A. chimaeric Duck with the head of a chick. Nature. 184 : B.A. 78 - 79.

85 - Shapiro, H.T. (1997). Ethical and policy Issues of Human cloning. Science. 277: 195 - 196.

86-Shuldiner,A.R.(1996)Trqnsgenic animals.N.Engl.J.Med. 339:653 - 655.

87 - Simons, J.P; wilmut I; Clark, A.J.; Archibald, A.; Bishop, J.O. and latho; R. Gene transfere into Sheep. Biotechnol. 6 : 179 - 183.

88 - Slack, J.M.W. (1996). High hops of transgenic frogs. Nature. 383 : 765 - 766.

89 - Solter, D. (1988). Differential imprinting and Expression of Maternal and paternal genome Annu, Rev. Genet. 22: 127 - 146.

90 - Solter, D. and Knowles, B.B. (1975). Immunosurgery of mouse blastocyst. proc. Nat. Acad. Sci USA. 72: 5099 - 5102.

91 - Stranzinger, G.F.(1984). Problems of Genetic engineering in animal breeding Genetic Manipulation: Impact on man and Society, Arber, W. et al (edit). PP. 235 - 238. the ICSU Press.

- T -

92 - Tarkowski, A.K. (1959). Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. Nature. 184 : 1286 - 1287.

93 - Timson, J. (1993). Preparative techniques in Micromanipulation. chapter 2. PP. 21 - 35. In: Gamete and embryo Micromanipulation in human reproduction, Edited by : Fishel, S. and Symonas, M. Edward Arnold publication.

94 - Tsien, J.Z. (2000) . Building a brainier mouse Scientific American April 2000 PP. 62 - 68.

- W -

95 - Weiss, R. (1997). Scottish Scientists clone adult sheep. page Ao1. the Washington post.

96 - Weiss, M.J. and Orkin, S.H. (1996). In Vitro differential of murine embryonic stem cells: New approachesion to old problems. J. clin. Invest, 97 : 591 - 595.

97 - Willadsen, S.M.(1981).The developmental capacity of blastomeres from 4 and 8-cell sheep embryos.J. Embryol. exp. Morph. 65: 65 - 172.

98 - Willadsen, S.M. (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature 320 : 63 - 65.

99 - Williams N. (1997). Will Dolly send in the clones?. Science. 275. 7 march 1997 P. 1415.

100 - Wilmut,I.(1998). Progress in combining embryo techinques and gene technology. Acta. Aric. Scand . A. Animal Sci - suppl.29: 37- 43.

101 - Wood, S.A.; Allen, N.D.; Rossant, J; Auerbach, A. and Nagy, A. (1993). Non - injection methods for the production of embryonic Stem cell - embryo chimaeras. Nature 365 : 87 - 89.

- Z -

102 - Zeilmaker, G.H. (1973). Fusion of rat and mouse morulae and formation of chimaeric blastocysts. Nature 242 : 115 - 116.

قراءات إضافية مقترحة

1 - Human Longevity. (1993). Smith, D.W.E. Oxford university Press.

2 - Reversing Human Aging. (1996). by: Fossi, M. william and Co publication.

3 - The making of a fly: The Genetics of animal design. (1992). Peter A. Lawrence Blackwell Scientific publication.

4 - Remaking Eden: Cloning and beyond in a brave new world. (1997). Steven, L.M. Avon Books publication.

5 - Clone: The road to Dolly: and the path ahead. (1998). Kolat, G.B. Morrow publiction.

6 - Genetic engineering of animals. (1986). Evans. J.W. and Hollaender, A. Plenum publication.